



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV POTRAVINÁŘSKÉ CHEMIE A
BIOTECHNOLOGIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ ZMĚN POPULACE KVASINEK PŘI VÝROBĚ ČERVENÉHO VÍNA

MONITORING OF CHANGES OF YEASTS POPULATION IN THE PRODUCTION OF RED WINE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. PETR DUCHÁČ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0670/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Petr Ducháč	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Dana Vránová, Ph.D.	
Konzultanti:	prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.	

Název diplomové práce:

Sledování změn populace kvasinek při výrobě červeného vína

Zadání diplomové práce:

1. Literární přehled o možnostech identifikace kvasinek
2. Realizace zvolené metody a její aplikace na řešený problém
3. Zpracování výsledků a jejich zhodnocení

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Petr Ducháč
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce byla identifikace kvasinek izolovaných během kvašení vinného moštu. Vinný mošt byl získán z odrůdy Rulandské modré pěstované v integrované a ekologické produkci. Partnerem této diplomové práce bylo vinařství Holánek.

V teoretické části práce byl kladen důraz na informace o determinantech kvality vína, kvasinkách a metodě PCR-RFLP. Byly popsány fyziologické vlastnosti kvasinek a také byly vysvětleny principy polymerázové řetězové reakce (PCR).

V experimentální části práce byla pro identifikaci kvasinek použita molekulárně biologická metoda PCR-RFLP. Byl amplifikován specifický úsek DNA (5,8S-ITS rDNA) pomocí primerů ITS1 a ITS4. Amplikony byly následně naštěpeny pomocí restričních endonukleáz HaeIII, HinfI a TaqI. Vzniklé restriční fragmenty byly elektroforeticky analyzovány a izolované kvasinky byly identifikovány a taxonomicky zařazeny na úrovni rodů a druhů.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is the identification of yeasts isolated during grape must fermentation. The must was obtained from Pinot Noir varieties grown in an integrated and organic production. The partner of this thesis was a winery Holánek.

In the theoretical part of the work was the emphasis on information about the determinants quality of wine, yeasts and PCR-RFLP method. Physiological properties of yeasts were described and also the principles of the polymerase chain reaction (PCR) were explained.

In the experimental part of the thesis was applied molecular biology method PCR-RFLP for identification of yeasts. The specific segment of DNA was amplified (5, 8S-ITS rDNA sequencing) with the help of ITS1 and ITS4 primers. The incurred amplicons were digested by applying restriction endonucleases: HaeIII, HinfI and TaqI. Subsequently the restriction fragments were analysed by using of electrophoresis. The yeasts were identified and classified by taxonomy on the level of genera and species.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvalita vína, kvasinky, identifikace, PCR-RFLP

KEY WORDS

Wine quality, yeasts, identification, PCR-RFLP

DUCHÁČ, P. *Sledování změn populace kvasinek při výrobě červeného vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 79 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych touto formou poděkovat Mgr. Daně Vránové Ph.D. za cenné rady, připomínky, trpělivost a čas při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Haně Šuranské za odbornou podporu při práci v laboratoři. Velký dík patří mé rodině za morální a finanční podporu po celé vysokoškolské studium.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	VÍNO A JEHO KVALITA	8
2.1.1	<i>Historie vína.....</i>	8
2.1.2	<i>Rulandské modré a další odrůdy pro výrobu červených vín</i>	8
2.1.2.1	Rulandské modré.....	9
2.1.2.2	Další odrůdy pro výrobu červených vín.....	9
2.1.3	<i>Faktory ovlivňující stupeň kvality vína</i>	10
2.1.4	<i>Posouzení senzorické kvality vín.....</i>	13
2.1.5	<i>Trendy v zabezpečování kvality vín.....</i>	14
2.1.5.1	Systém managementu kvality (QMS)	14
2.1.5.2	HACCP.....	14
2.2	TECHNOLOGIE VÝROBY ČERVENÉHO VÍNA	15
2.2.1	<i>Proces výroby červeného vína.....</i>	15
2.2.2	<i>Produkční systémy ve vinohradnictví.....</i>	16
2.2.2.1	Ekologická produkce vína.....	16
2.2.2.2	Integrovaná produkce	17
2.2.3	<i>Perspektivní molekulární biotechnologie ve výrobě vína</i>	18
2.3	MIKROORGANISMY VÝZNAMNÉ PRO VÝROBU VÍN	19
2.3.1	<i>Úvod do světa kvasinek</i>	20
2.3.1.1	Zařazení a obecná charakteristika vinných kvasinek	20
2.3.1.2	Kvasinková buňka a její struktura	21
2.3.1.3	Průmyslově významné kvasinky	22
2.3.2	<i>Vliv kvasinek na celkový charakter vína</i>	23
2.3.2.1	Metabolismus kvasinek	24
2.3.2.2	Enzymatická hydrolýza komponent hroznů	25
2.3.2.3	Autolýza a bioadsorbce	25
2.4	IDENTIFIKACE KVASINEK.....	26
2.4.1	<i>Kvasinkový profil v průběhu cyklu výroby vín</i>	27
2.4.1.1	Hrozny a kvasinkový profil.....	27
2.4.1.2	Vinný mošt a kvasinkový profil	27
2.4.1.3	Fermentace a kvasinkový profil	28
2.4.2	<i>Vývoj a přehled technik pro identifikaci kvasinek ve víně</i>	28
2.4.2.1	Genetická informace jako klíč k identifikaci	29
2.4.2.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	30
2.4.2.3	PCR-RFLP	32
3	PRAKTICKÁ ČÁST.....	34
3.1	SUROVINY	34
3.2	CHEMIKÁLIE.....	34
3.3	PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	34
3.4	PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ	35
3.4.1	<i>Příprava TBE pufru.....</i>	35
3.4.1.1	Příprava 10×TBE pufru.....	35
3.4.1.2	Příprava 1×TBE pufru.....	36
3.4.1.3	Příprava 1×TBE pufru s ethidium bromidem.....	36
3.4.2	<i>Příprava ethidium bromidu.....</i>	36

3.4.3	<i>Příprava 2 % agarózového gelu</i>	36
3.4.4	<i>Příprava délkových standardů 20 a 100 bp</i>	36
3.4.5	<i>Příprava 3 M octanového pufru</i>	36
3.4.6	<i>Příprava 80 % ethanolu</i>	37
3.5	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA	37
3.5.1	<i>Příprava šikmých agarů</i>	37
3.6	PRACOVNÍ POSTUPY	37
3.6.1	<i>Postupový diagram</i>	37
3.6.2	<i>Ganttův diagram</i>	39
3.6.3	<i>Odběr vzorků a jejich zpracování</i>	40
3.6.4	<i>Izolace čisté kultury kvasinek</i>	40
3.6.5	<i>Izolace DNA</i>	41
3.6.6	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i>	42
3.6.6.1	<i>Příprava PCR směsi</i>	42
3.6.6.2	<i>Průběh PCR reakce</i>	43
3.6.7	<i>Elektroforetická detekce PCR produktů</i>	43
3.6.8	<i>Přečištění PCR produktů</i>	44
3.6.9	<i>Restrikční analýza</i>	44
3.6.10	<i>Elektroforéza restrikčních fragmentů</i>	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
4.1	<i>ODBĚR VZORKŮ A JEJICH ZPRACOVÁNÍ PRO IZOLACI DNA</i>	46
4.2	<i>POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)</i>	46
4.3	<i>RESTRIKČNÍ ANALÝZA PRODUKTŮ PCR</i>	47
4.3.1	<i>Restrikční analýza pomocí restrikční endonukleázy HaeIII</i>	47
4.3.2	<i>Restrikční analýza pomocí restrikční endonukleázy HinfI</i>	49
4.3.3	<i>Restrikční analýza pomocí restrikční endonukleázy TaqI</i>	51
4.4	<i>TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ KVASINEK</i>	53
4.5	<i>DENDROGRAMY IDENTIFIKOVANÝCH KVASINEK</i>	57
5	ZÁVĚR	58
6	POUŽITÁ LITERATURA	59
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	64
8	SEZNAM PŘÍLOH	66
9	PŘÍLOHY	67

1 ÚVOD

V současné době existuje v naší globalizované společnosti tolik nepřeberného množství nápojů, z nichž ovšem jen malá část z nich si získala srdce tolika lidí jako je tomu například u vína. Někdo by mohl říci, že konkurovat by mu jistě mohly takové potraviny a nápoje, jakými jsou pivo, sýr, čaj, koření atd. Pravdou je, že žádný z těchto vyjmenovaných příkladů nedokáže působit při degustaci na naše smysly tak různorodě a intenzivně, jako je tomu u vína. Tento nápoj si stále drží unikátní pozici mezi nápoji i v tom, jak dokáže propojit celý svět, protože se vyskytuje jak v nejhudších domácnostech, tak i u těch domácností, které jsou více ekonomicky silnější. Zajímavý fenomén, který víno doprovází, je jistě jeho schopnost navodit stav euforie. I proto se z něj stalo za staletí nápoj, který je oblíbený při společenských akcích, oslav a formálních sešlostí. Zmíněné psychologické a sociální aspekty vína jsou spolu s mikrobiálními a fyzikálními charakteristikami to, co z vína tvoří onu unikátnost [1].

Kvalita vína je čím dál více rozhodujícím kritériem při výběru vína. Určuje i cenu vína, která se liší podle vlastností a parametrů vína. V moderní době je kvalita obecně definována jako stupeň splnění požadavků souborem inherentních charakteristik. Inherentní charakteristika je rozlišující vlastnost produktu, procesu nebo systému týkající se požadavku. Všechny požadavky jsou vytvářeny zákazníkem, který si produkt kupuje za odpovídající finanční obnos. V současnosti se proto využívá tzv. systému managementu kvality, který zabezpečení kvality pomáhá splnit prostřednictvím řízení kvality [2, 62].

Víno je charakterizováno komplexem vlastností, které ovlivňují naše vnímání ať už pozitivně či negativně. Patrně nejdůležitějšími elementy, které se podílí na tvorbě kvality tohoto kulturního nápoje, jakým bezesporu víno jistě je, jsou hroznové víno a kvasinky. Asociace těchto dvou elementů bylo z historického hlediska velmi významné. V dobách, kdy neexistovaly moderní balící a skladovací systémy potravin bylo na víno pohlíženo jako na „Boží nápoj“, který bylo možné dlouhodobě skladovat bez ztráty jeho nutriční hodnoty a senzorických atributů, jež ho tvořily. Poměrně trefně a s jistou ironií se do úvahy o víně zapojil skotský vědec a spisovatel John Stuart Blackie, který řekl: „Vino je nápoj bohů, mléko nápoj kojenců, čaj nápoj žen a voda nápoj zvířat“ [1].

První podmínkou úspěšné výroby, kde na konci můžeme očekávat kvalitní produkt, jsou nezávadné, dobře vyzrálé hrozny révy vinné. Ty mohou být sklizeny pouze ze zdravých, proti chorobám dobře ošetřených keřů vinné révy. Na dodržování legislativy určující správné zpracování hroznů, výroby vína a jeho označování dohlíží Česká zemědělská a potravinářská inspekce v Brně [13].

Kvalita vína je také, jak bylo řečeno, z velké části ovlivněna různorodostí mikroorganismů a to zejména kvasinkami. Kvasinky jsou jednobuněčné houby, které se rozmnožují pučením. Vyskytují přirozeně na povrchu bobulí a ve vinařském prostředí. Na hrozny se dostávají vzduchem nebo se šíří hmyzem. Po rozrušení bobulí začíná proces přeměny vinného moštu ve víno, čili se iniciuje alkoholová fermentace.

Mikroorganismy ovlivňují nejen kvalitu vína, ale i jeho dlouhodobou uchovatelnost. K jejich identifikaci jsou využívány postupy založené na schopnosti mikroorganismů využívat rozdílné formy uhlíku a dusíku, na schopnosti syntézy specifických metabolitů nebo aktivity určité biochemické cesty. Nicméně všechny zmíněné postupy požadují významné množství času pro kultivaci mikroorganismů a tak je tedy možné získat výsledky až za několik dnů či týdnů. Tím by ovšem vinaři nemohli být schopni rychle reagovat na změnu mikroflóry, která by také mohla mít negativní vliv na kvalitu výsledného produktu. V současnosti jsou

používány molekulárně biologické metody založené na analýze DNA. Jednou z nich je PCR-RFLP. Použitím této metody je možné minimalizovat a eliminovat nevhodné mikroorganismy v krátkém [4].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Víno a jeho kvalita

2.1.1 Historie vína

Starobylost tohoto nápoje plyne již ze starých pověstí a záznamů Bible, kdy se hovoří, že Noe, který jediný se svou rodinou přežil potopu světa, pěstoval ve velkém množství vinnou révu. Z Bible také plyne, že přistál na hoře Ararat, která je svojí polohou hranicí mezi Tureckem a Arménií, tedy v oblasti dnešní Gruzie [5].

To zda, je tato legenda pravdivá či není, záleží čistě na naší důvěře v ní. Víno se začalo vyrábět přibližně 10000 let př. n. l. v oblasti Gruzie a Arménie. Jisté je, že název víno pochází ze slova gvino, které je gruzínského původu. Na naše území se toto pojmenování dostalo s příchodem Římanů, avšak z římského vinum. Historickými nálezy bylo potvrzeno, že sběrem vinné révy se zabýval i člověk doby kamenné, čímž se také uvažuje o prvním možném opojném požitku zkvašené šťávy z bobulí. Důkazy archeologů také potvrzují pěstování vína na územích dnešního Íránu a Číny v době asi šest tisíc let před n. l. [5, 12].

Ve starověkém Egyptě bylo víno používáno k tomu, aby faraóni v posmrtném životě měli dostatek tohoto uctívaného nápoje, proto se nalévalo do speciálních forem a ukládalo do faraónských hrobek. Staří Egyptané věřili, že víno je darem boha Osirise. Vinná réva se v Egyptě pěstovala podél řeky Nilu i v jeho deltě [5, 13].

Ve starověkém Řecku začaly vznikat poměrně vyspělá vinařství. Řekové věřili, že dárcem révy a zakladatelem vinařství je bůh Dionýsos. Z Řecka se vinařství dále rozšířilo do Itálie, Sicílie, Španělska a do Černomoří. Také další obyvatelé středomoří přispěli k rozšíření a oblíbě tohoto nápoje, byli jimi Fénici. Ti zakládali vinice v severní Africe a jižní Francii. Ve Francii se od nich naučili pěstovat vinnou révu Galové. Dědicové řecké kultury, Římané, zase rozšiřovali pěstování vína po celé své velké říši, čímž se také začalo pěstovat víno v našich lokalitách, především na Moravě pod pálavskými kopci, odkud se rozšířilo po celé jižní Moravě. Chtělo by se říct: buďte požehnáni Římané [5, 13]!

O rozvoj vinařství v Čechách se zasloužil Karel IV., který přivezl vinnou révu z Burgundska a nechal ji vysázet v Praze a na Karlštejně. Lze tedy jasně deklarovat a konstatovat, že víno doprovází člověka už od počátku jeho existence a víno se tak stalo symbolem vzniku naší civilizace. V dnešní době se stalo vinařství spojením vědy a technologie, což vede ke zvyšování požadavků na znalosti výrobců [13, 34].

2.1.2 Rulandské modré a další odrůdy pro výrobu červených vín

V České republice patří červené víno mezi oblíbené nápoje a pro to je jeho produkce velmi četná. Z celkové produkce červených a bílých vín je asi třetina tvořena právě červeným vínem. Pěstují se u nás převážně révy s modře zbarvenými bobulemi hroznů. Faktem však je, že v našich geografických podmínkách je mnohem výhodnější pěstovat víno bílé [5].

Červené víno obsahuje oproti bílému vínu další složky, jako jsou třísloviny a červené barvivo. Dalším podstatným rozdílem, který reflektuje klimatické podmínky je obsah kyselin. Zatímco u bílého vína je běžné, že obsahuje vysoké množství kyselin, u červeného je jejich vyšší koncentrace spíše nedostatkem. Bohužel v našich podmínkách jsou větší předpoklady mít kyselější vína (též nazývaná tvrdá) s nižším obsahem tříslovin [5].

2.1.2.1 Rulandské modré

Rulandské modré je odrůda původem z Francie, proto je také ve světě známa pod názvem Pinot Noir, avšak tradiční odrůdou je i v Čechách a na Moravě. Ve Francii je hlavní odrůdou dvou vinařských oblastí, Burgundska a Champagne. Z tamních odrůd se vyrábějí věhlasná vína, proto pěstování tohoto vína je vysoce rentabilní záležitost. Kvalita vín z těchto odrůd se nedá imitovat, neboť souvisí s přírodními podmínkami [5, 45].

Odrůda vykazuje dobrou odolnost vůči mrazům a hrozny se většinou vyznačují vysokou cukernatostí. Vína jsou plná a vhodná pro zrání v sudech i v lahvích. Víno disponuje světle granátovou barvou. Správně vyškolená vína jsou přitažlivá pro nižší obsah kyselin, plnost, hebkost, a kořenité vůně: nejprve po ostružinách, černých třešních, pak po švestkách a povidlech. Jsou vhodná k dlouholetému uložení [5, 45].



Obr.1: Odrůda Rulandské modré [27]

2.1.2.2 Další odrůdy pro výrobu červených vín

- Portugalské modré

Víno této odrůdy se k nám rozšířilo z Rakouska, kam se dostalo roku 1772 z Portugalska. Výhodou této odrůdy je její mrazuvzdornost a suchovzdornost. Je bujného růstu s velkým negativním potenciálem k napadení škůdci, kteří jsou houbového původu. Úrodnost této odrůdy je vinaři hodnocena jako výborná a pravidelná. Odrůdy se využívají na výrobu stolních vín, kde je obsah alkoholu 10 až 11 % [5, 45].

- Svatovavřínecké

Tato odrůda pochází z Francie, kde se nazývá Saint Laurent. Je podobná burgundským odrůdám. Dříve bylo její rozšíření poměrně veliké, avšak dnes tuto odrůdu nalezneme jen v Rakousku a u nás. Důvodem jejího malého rozšíření je tvrdost a hrubost vyráběných vín. Odrůda je bujného růstu a stejně jako Portugalské modré suchovzdorná a mrazuvzdorná. Musí se dát veliký pozor ve vlhkých obdobích na možnost napadení parazity. Vyráběné víno má

vyšší obsah kyselin a z odrůd se vyrábí tzv. známkové víno, kde jsou právě kyseliny vítané při spojování se zahraničními víny z jižních oblastí [5, 45].

- Frankovka

Frankovka je pravděpodobně rakouská odrůda. Patří k našim nejhodnotnějším modrým odrůdám. Odrůda je bujná a mrazuvzdorná. Víno se vyznačuje poměrně vysokou kvalitou, která je však podmíněna pěstováním odrůdy na štěrkovité půdě a v teplé oblasti. Vína se hodí pro zrání v lahvích, přičemž hlavními producenty jsou Rakousko a Německo, kde se Frankovka pěstuje kolem Neziderského jezera a označuje se Limberger. U nás je nejznámější pěstování Frankovky z velkopavlovické oblasti [5, 45].

- Zweigeltrebe

Tato odrůda vznikla křížením Frankovky a Svatovavříneckého. Byla vyšlechtěna panem Zweigelttem, ředitelem vinařské školy v Klosterneuburgu roku 1922. Původem je z Rakouska, kde se označuje Rotburger. Rostlina je bujného růstu vykazující mrazuvzdornost, přičemž sklizně jsou poměrně pravidelné a bohaté. V prvním roce jsou většinou vína hrubšího charakteru, avšak po svém vyzrání jsou harmonická a odrůdově typická. Je to odrůda, která se velmi dobře hodí pro výrobu růžových vín s říznou kyselinou a jemnými tříslovinami [5, 45].

- André

Křížením odrůdy Frankovky a Svatovavříneckého vznikla také další odrůda, tj. André. Její původ je u nás a její velikou výhodou je mimořádná odolnost proti mrazům. Mezi nevýhody se řadí špatný a slabý růst s malou úrodností. Je tedy nutná vinařská znalost k pěstování této odrůdy. Víno je vhodné nechat dobře vyžrát, aby se snížila jeho tvrdost [5].

- Neronet

Odrůda je typická tím, že má červené barvivo nejen ve slupce, ale i ve šťávě z bobulí. Opět se jedná o odrůdu vzniklou křížením, tentokrát odrůd Svatovavřínecké, Portugalské modré, Alicante Bouschet a Cabernet Sauvignon. Vyšlechtěna byla panem Václavem Krausem v Lednici. Odrůda je bujného vzrůstu a vykazuje pravidelné plození. U odrůdy Neronet jsou cukry získané asimilací ihned transformovány na barviva a třísloviny, takže jejich cukernatost nebývá vysoká. Víno lze získat běžným nakvašováním na rmutu. Vína jsou vhodná ke spojování s jinými červenými víny, kterým dodávají barevnost, zvyšují obsah tříslovin, ale jejich charakter nenaruší [5, 45].

- Cabernet Sauvignon

Poměrně známá odrůda pochází z francouzské vinařské oblasti Bordeaux. Vznikla nahodilým křížením odrůd Cabernet Franc a Sauvignon. Keř této odrůdy je bujný a úrodnost je středního charakteru. Vína jsou bohatá na obsah taninu, antokyanů a kyselin. Bobule mají typické aroma připomínající černý rybíz. Víno zraje pomalu a je nutné jeho školení v sudech [5, 45].

Cabernet Sauvignon je typický svým velkým rozšířením pro svoji kvalitu a dlouhou uchovatelnost. Odborníci vždy radí, aby se vína nechala, pro získání nejvzácnějších tónů zralosti a plnosti, zrát v sudech barrique (dubové, obsah 225 l, vypalované) a dlouhodobě ukládat do lahví [5, 45].

2.1.3 Faktory ovlivňující stupeň kvality vína

Víno patří mezi produkty, které se vyznačují širokým rozmezím kvality. V obchodech se každý může setkat s nepřeberným množstvím druhů vín, které nás mohou zaujmout různými tvary lahví, barevnými etiketami (obsahující doplňující informace) a různými popisy

zdůrazňující kvalitu a tradici. Zákazník má velmi těžké rozhodování, které z vín si vybrat. V praxi se osvědčilo sdílet zkušenosti o kvalitě vín s přáteli, výrobcí, prodejci atd. [24].

Na vnímání kvality vína může mít vliv mnoho faktorů:

- ***Tržní hospodářství a cena vína***

Cena vína v obchodech vždy nekoresponduje s jeho kvalitou. Vodítkem k určení kvality vína může být zařazení vína do určité kvalitativní třídy. V rámci jedné kvalitativní třídy ovšem existují značné rozdíly v cenách vín. Důvodem mohou být zpravidla dražší zahraniční vína než tuzemská, ačkoliv se dnes cenově přibližují. Dalším důvodem může být psychologický efekt spočívající ve vnímání ceny zákazníkem, kdy neočekává, že za nízkou cenu by mohl dostat kvalitní víno. Cenu vína také ovlivňuje estetičnost a druh obalových materiálů, kdy vína mohou být plněna do lahví či papírových krabic. Často také za vysokou cenou stojí prodejce přidávající si desítky procent na marži a producent vína, jež chce přílišný zisk [5, 32, 63].

Bez účinného marketingu dnes nelze efektivně víno prodávat, i když bude toto víno kvalitní. Marketing zahrnuje všechna opatření podporující odbyt produktu. Získat nové zákazníky je desetkrát až patnáctkrát dražší než udržet stávající zákazníky, proto je nutné udržet kontakt se zákazníky. Pro nové producenty vína je velmi těžké se na trh propracovat, nicméně správnými marketingovými nástroji a strategií lze nepřímo zvyšovat kvalitu vína zvyšováním jeho prodeje a také lze určit, po jaké úrovni kvality vín je nejvyšší poptávka [56].

Další vliv na cenu má jistě i ruka trhu. Ekonomickým pravidlem vždy bylo, že čeho je málo, to je také drahé. Můžeme si všimnout, že ty nejdražší vína jsou zpravidla na trh dodávána v malých množstvích a jsou z tradičních oblastí [32].

Je tedy možné říct, že na víno má vliv jeho prestiž, jeho dostatek či nedostatek na trhu a kvalita. Vždy však bude záležet na nás, zda si jej koupíme či nikoliv.

- ***Druh vína***

Na kvalitu vína má svůj vliv i druh vína a jeho barva. Platí, že bílá, růžová a lehká červená vína se zpravidla konzumují ihned bez dalšího zrání. U těchto vín se využívá čerstvosti spojené s primární chutí odrůdy. Oproti tomu, většina červených vín a proslulých bílých vín potřebují stárnout, aby se zjemnila kyselost a zušlechtily taniny. Během zrání také mohou přecházet látky ze sudu, pakliže je víno v sudu skladováno [33].

Druhy vína se v České republice rozdělují podle obsahu cukru, tedy cukernatosti. Cukernatost je podle vinařského zákona č.321/2004 Sb. v aktuálním znění nejdůležitějším parametrem pro klasifikaci vín. Vinařský zákon rozděluje vína podle cukernatosti následovně:

- **Stolní víno**

Jsou zde zahrnuta nejlevnější a nejméně kvalitní vína. Vína nesmí být značena názvem odrůdy, oblasti nebo vinařské oblasti. Toho se někdy zneužívá výrobci ve smyslu, že víno nemusí pocházet z České republiky, ale může být dovezeno z jakékoliv země EU a v ČR jen lahvováno. U této kategorie vín platí také méně přísné požadavky na produkci.

- **Zemské víno**

Kvalitnější druh vína je zemské víno. Musí být vyrobeno pouze z domácích hroznů. Může být označeno názvem oblasti, ročníkem a také z jaké odrůdy bylo vyrobeno.

- **Jakostní víno**

Do tohoto druhu vín patří taková, která splní požadavek, že jsou vyrobena z tuzemských hroznů z jedné vinařské oblasti. Výroba tohoto vína musí být provedena

v oblasti, kde byly sklizeny hrozny. Jakostní vína se dále rozlišují na odrůdové, které je vyrobeno maximálně ze tří různých odrůd, a na víno známkové, které je vyprodukováno ze směsi různých odrůd.

- **Jakostní víno s přívlastkem**

Kvalitní vína lze najít v této kategorii vín. Vína jsou vyrobena z vinných hroznů, které byly sklizeny v téže oblasti. Víno je zkontrolováno inspekcí z hlediska původu, cukernatosti a hmotnosti. Mezi vína s přívlastkem patří kabinetní víno, pozdní sběr, výběr hroznů, výběr z bobulí, výběr z cibéb, ledové víno a slámové víno [34, 35].

- **Složení vína**

Fyzikálně-chemickými rozbory lze zjistit, jaký je obsah základních složek vína. Složení vína je určujícím předpokladem pro splnění našich smyslových požadavků na víno. Složení je úzce spjata i se stanovištěm pro pěstování vína často označovaném francouzským pojmem *terroir*. *Terroir* označuje všechny faktory, které na révu vinnou v přírodních podmínkách působí. Každé *terroir* ovlivňuje kvalitu hroznů a biochemické reakce. Mezi faktory ovlivňující révu patří klimatické podmínky (teplota, proudění vzduchu, sluneční záření a srážky), typ půdy, umístění vinice, druh odrůdy a lidský faktor, který je krucální pro samotný výsledek [46].

Je zjištěno, že víno obsahuje velké množství látek, které jsou přítomny buď již v mošttech, nebo vznikají během kvašení činností mikroorganismů. Ve víně lze také nalézt látky, které jsou tzv. cizorodé. Ty se do vína dostávají během technologického procesu a jsou buď běžnou součástí vín, nebo do vína striktně nepatří. Víno se obvykle skládá z okolo 85 % - 90 % vody, 10 - 15 % alkoholu, 0,4 - 1 % glycerolu a z 0,5 - 1,5 % kyselin. Zbývající 1 % tvoří těkavé sloučeniny ovlivňující chuť. Sloučeniny ovlivňující chuť mají obvykle nízký detekční práh, tudíž stačí malé množství těchto molekul k předání chuti vínu [5, 25].

K určení kvality složení bobulí, jako prekurzorů vína, se používají následující parametry a metody k jejich měření shrnuté v tab. 1.

Tab. 1: Vybrané parametry a metody pro stanovení složek a charakteru vína [34].

Kvalitativní parametr	Možnost stanovení
Cukernatost	refraktometr, moštoměr
Titrovatelné kyseliny	titrace s hydroxidem sodným
pH	pH metr
Organické kyseliny – kyselina jablečná a vinná	kapalinový chromatograf, enzymatický test
Fenolické látky – barviva, taniny	kapalinový chromatograf
Aromatické látky	G-G analýza, plynový chromatograf
Fenolická zralost	senzorické hodnocení podle barvy a chuti slupky a barvy a chuti semene
Aromatická zralost	Senzorické hodnocení zbarvení slupky a chuťové vlastnosti bobule

- **Výrobce vína**

Výrobce vína je základním prvkem určující podmínky skladování, výroby a balení vína. Musí zajistit dokonalou sanitaci podniku, aby nebyl cizorodými organismy porušen správný profil mikroorganismů během kvašení. Výrobce musí eliminovat co nejvíce faktorů, které by mohly kvalitu vína ovlivnit. V opačném případě by se mohlo stát, že každá šarže či dokonce

láhev vína by mohla vykazovat jiné kvalitativní znaky. Technologický proces, který produkuje opakovatelně stejné produkty, se označuje jako způsobilý [5, 64].

Vliv velikosti podniku, ve kterém se víno vyrábí, nehraje významnou roli v kvalitě výsledného produktu, pokud jsou splněny požadavky na spolehlivost strojů a jejich údržbu, na hygienické podmínky a na operativní důslednost. U velkých podniků je navíc zapotřebí, aby disponovaly moderním strojním zařízením, které zaručí rychlé zpracování vykoupených hroznů. Pro skladování a zrání vína využívají vysokokapacitní ocelové tanky, což zaručuje stejnou kvalitu u všech vín. Je dobře, že v posledních letech si většina hlavně malých producentů uvědomuje, že je třeba řídit celý technologický proces z hlediska jeho způsobilosti ke standardní produkci kvalitního vína [5].

Problematika hodnocení způsobilosti je poměrně složitá a v průmyslu ji charakterizují indexy způsobilosti, které vycházejí ze znalostí statistiky, ke které je nutný dostatečný sber dat. Výrobní proces musí být ve statisticky zvládnutém stavu, což znamená, že variabilita určitého znaku (např. změna obsahu určité složky vína) je vyvolána jen působením náhodných příčin (náhodné příčiny odstranit nelze), které přispívají k variabilitě procesu, avšak malou měrou. Míní se tím např. chvění stroje, nestejnorodost materiálu nebo drobné výkyvy v elektrickém napětí. Oproti tomu jsou však příčiny variability (např. systematická chyba), které mohou být odstraněny, protože jsou zdrojem variability, které za normálních okolností na proces nepůsobí. U zpracování vína jsou těmito zdroji variability např. poškození nástroje, změna seřízení stroje, změna materiálu nebo nezaškolená obsluha stroje [36, 37].

2.1.4 Posouzení senzorické kvality vín

Kvalita vína je dána jeho složením, avšak jen některé látky lze ve víně běžnými analytickými metodami stanovit. Degustace vína (senzorické hodnocení, smyslové hodnocení) dává lepší přehled o kvalitě, odrůdovém charakteru, místě původu a vadách vína než chemická analýza. Proto hodnocení kvality vína provádějí k tomu vyškolení specialisté mající senzorické zkoušky v hodnocení vín. Před samotnou degustací je nutné splnit požadavky na víno a to, že musí být zcela čisté, musí mít správnou teplotu, musí být v okamžiku degustace otevřené [56, 60].

Čichová sliznice lidského nosu obsahuje asi pět miliónů čichových buněk. Vjem vzniká tak, že aromatické látky jsou spolu s vdechovaným vzduchem nasávány do nosu a vyhodnocovány receptory ve sliznici. Jazykem lze zjistit čtyři základní chutě – sladkou, kyselou, slanou a hořkou. Vůně a chuť působí současně. Při polknutí se v měkkém patře otvírá přepážka mezi nosem a hrtanem a tím vzniká dojem, že aroma vychutnáváme i při polykání, ale ve skutečnosti je vnímáno pouze nosem. O kvalitě požitku z vína rozhoduje i tvar skleničky [56, 60].

Víno se hodnotí buď popisně, bodovým hodnocením nebo metodou stanovení pořadí, přičemž degustátor má pouze čtyři minuty na hodnocení vzorku. Zpravidla se toto hodnocení dělá elektronicky, čímž vyhodnocení může probíhat rychleji. Je nutné degustovat víno, které je ideálně temperováno. Jestliže má vinař zájem o posouzení kvality svého vína, je nutné, aby splnil seznam požadavků na hodnocení vína, mezi které patří:

- čistý a stabilní vzorek,
- bezchybný vzorek (neovlivněný pachutí z hadic, pachutí po filtračních deskách),
- obsah SO₂,
- žádost o posouzení s kompletními a správnými údaji, které umožní správné, zařazení (především o zbytkovém cukru a obsahu alkoholu),

- správný popis na lahvi,
- včasné dodání vzorků [56, 60].

2.1.5 Trendy v zabezpečování kvality vín

2.1.5.1 Systém managementu kvality (QMS)

Způsob chápání kvality v sobě skrývá vývoj trvající desítky let. Dříve byla kvalita chápána jako způsobilost k užití nebo jako shoda s požadavky. Nejznámější definici kvality poskytují normy ISO ř. 9000. V nich je kvalita pojímána jako stupeň splnění požadavků souborem inherentních charakteristik. Inherentními charakteristikami vína mohou být např. chuť, vůně, barva atd. Tyto normy mají významný dopad na technologické výroby a celkové řízení kvality [2, 38].

Cílem řízení kvality ve vinařství je plánovat, řídit, prokazovat a zlepšovat kvalitu vína v podniku. Toho je dosaženo, bude-li ve společnosti fungovat správně systém managementu kvality (SMJ). SMJ pomáhá provázat zmíněné čtyři cíle managementu kvality prostřednictvím vzájemně souvisejících prvků (procesy, lidé, materiály, informace, zařízení atd.). Bude-li společnost řízena komplexně, nikoliv odděleně, může být zajištěna vyšší kvalita řízení. Příkladem může být lidské tělo, ve kterém všechny orgány spolupracují a navenek působí synchronním dojmem nebo budou-li dva výborní tenisté hrát proti dvěma slabým tenistům, je možné, že slabí tenisté vyhrají, budou-li hrát jako tým. Tomuto jevu se říká synergní efekt. Synergie znamená, že celek je více než prostý součet jeho prvků. A proto také vznikl systém managementu kvality, který všechno a všechny ve firmě spojuje [2, 38].

2.1.5.2 HACCP

Výborný nástroj pro kontrolu mikrobiálních, fyzikálních a chemických rizik v rámci celého životního cyklu vína je analýza rizik metodou kritických kontrolních bodů (HACCP). Nejprve jsou identifikovány kontrolní body, ve kterých jsou největší rizika spojená s výrobou vína a následně se tyto kontrolní body kontrolují. Zavádění tohoto nástroje je povinně vyžadováno legislativou, čímž se garantuje, že vyrobené víno je zcela bezpečné. Funkční systém HACCP a jeho efektivní zavedení je potvrzováno třetí nezávislou stranou. Tím je umožněno soustředění se na bezpečnost výroby produktu jako na nejvyšší prioritu a také naplánování prevence neshod, což spočívá v nastavení kontrolních mechanismů [14, 28, 31].

Vytvoření a zavedení systému HACCP je nutností u všech výrobců v EU na základě Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) číslo 853/2004 o hygieně potravin. V současné době je k dispozici norma ČSN EN ISO 22000:2006 managementu bezpečnosti potravin a její certifikace je výhodná z toho důvodu, že je mezinárodně schválená a zahrnuje a podporuje i principy HACCP. Při implementaci HACCP systému je nutné, aby všechny procesy související s výrobou byly zahrnuty. Zaměstnanci musí být patřičně školeni a vybaveni zkušenostmi, které jim umožní dělat správná rozhodnutí. To zajistí, že každý má jediný cíl – bezpečnou potravinu [28, 29, 30].

2.2 Technologie výroby červeného vína

2.2.1 Proces výroby červeného vína

Hrozny na víno se zpracovávají různými technologickými postupy, které se vyvinuly v průběhu historického vývoje v souladu s lokalitou, druhem odrůdy, technickými možnostmi a společenskými tradicemi. Hlavní rozdíl v technologickém postupu bílých a červených vín spočívá v jiném způsobu získávání sensoricky aktivních látek ze slupek bobulí [11].

Výroba červeného vína je proces složený z těchto operací:

- **Doprava a skladování hroznů**

Hrozny, které byly sklizeny, se následně dopravují do zpracovatelských závodů k přejímce hroznů v různých obalech (bedny, kádě, kontejnery, přívěsy, návěsy) [7, 11].

- **Vážení hroznů a stanovení obsahu cukru**

Po příjmu hroznů je nutné zjistit jejich hmotnost, průměrnou cukernatost a kvalitu podle zdravotního stavu, odrůdy a obsahu cukru. Obsah cukru je jeden z ukazatelů kvality hroznů, což samozřejmě určuje i cenu produktu. Obsah cukru je určován pomocí moštoměrů. V České republice se hmotnost vyjadřuje v °NM (normalizovaný moštoměr), což vyjadřuje hmotnost cukru v kg ve sto litrech moštu. Někdy se také používá Klosterneuburský moštoměr (°KI), který udává množství cukru v hmotnostních procentech při teplotě 20 °C [7, 11].

Někdy lze také stanovit množství cukru refraktometricky. Zpravidla je využití této techniky používáno v automatizovaných provozech [11].

- **Mletí a nakvašování**

Mletí hroznů zpravidla probíhá současně i s tzv. odstopkováním. Odstopkování je děj, při kterém dochází k oddělení bobulí od třapin. Odstopkování zaručí, že se nedostanou (neextrahují) škodlivé látky ze stopek hroznů do moštu, čímž by se zhoršila sensorická kvalita konečného produktu. Těmito škodlivinami jsou chlorofyl a třísloviny [11].

Mletí probíhá v mlýnku tak, že pohybující se hřídel s lopatkami posouvají rozdrcené hrozny přes nerezové síto, kde rozrušené bobule jím propadají a speciálním čerpadlem se přepravují do kádě. Rozemleté hrozny i odzrněné se nazývají rmut. Rmut se mírně zasílí, čímž se zabrání činnosti nežádoucích bakterií a nechá se několik dní nakvášet při teplotě 20 – 25 °C. Z hroznů se nakvácením vyluhují barviva i aromatické látky, které jsou obsaženy ve slupce hroznů. Lze použít enzymy, které podporují rychlejší uvolňování tříslovin, které stabilizují barvu vína [7, 11, 41, 60].

- **Lisování**

Lisování slouží k oddělení tekuté fáze (šťáva, mošt), která byla uvolněna z buněk od tuhých složek (zbytků bobulí, které se označují matoliny) [7].

Princip lisování je definován jako zavedení tlaku do lisovacího systému, které způsobí zmenšení objemu tuhé fáze (stmelování) za současného odtoku kapalné fáze. Mošt protéká přes jemné póry lisu. Obvyklá výtěžnost moštu je asi 75 %. Lis může být největším zdrojem infekce ve sklepě. Počet zárodků v moštu se zvyšuje deseti- až stonásobně [7, 11, 41, 60].

- **Kvašení**

Je nutné, aby nádoby a sudy na kvašení byly hygienicky zcela čisté. Před naplněním jsou zasířeny oxidem siřičitým. Sudy a nádoby se plní do tří čtvrtin, protože mošt při kvašení bouřlivě pění a zvětšuje objem. Během procesu kvašení dochází k přeměně

cukru na ethanol, oxid uhličitý a teplo pomocí kvasinek. Optimální teplota kvašení je 16 – 18 °C. Je vhodné kvasící mošt chladit, protože při vyšších teplotách, než je uvedeno, dochází k úniku aromatických látek a alkoholu. Nakonec jsou nádoby dolity a opět zasířeny [41].

Moderní inovace naznačují, že by se kvalita produkce mohla zvyšovat díky imobilizaci buněk během alkoholové fermentace, což může přinést mnoho technologických a ekonomických výhod ve srovnání se systémem volných buněk. Pozitiva, které imobilizace přináší, jsou snížení nákladů, vyšší stupeň čistoty produktu, výtěžnost, vysoká odolnost a vhodnost pro nízkoteplotní imobilizace. Prozatím však imobilizace systémů nachází uplatnění v jiných odvětvích průmyslové praxe než ve vinařství. Problémem jsou totiž nosiče pro takové buňky, které jsou drahé. Taktéž nemáme tolik možností ovlivnit chuť vína během kvašení, jsou-li buňky imobilizované, přičemž životnost imobilizovaného systému není příliš velká ve srovnání se systémem volných buněk. Autoři [15] zmiňují simulace, které uvažují o využití kousků jablek a hrušek pro imobilizaci *Saccharomyces cerevisiae*. Tyto imobilizační systémy jsou velmi levné a také mohou zlepšit celkový charakter vína přenosem složek z těchto druhů ovoce, což může být ovšem překážkou, je-li podmínka tradiční výroby s určitým sensorickým charakterem vína [15].

- **Post-fermentační operace**

Vyskytuje-li se ve víně příliš mnoho kyselin, obzvláště kyseliny jablečné, která způsobuje drsnou chuť, je možné provést odkyselování. Odkyselování je prováděno v případě, že nelze předpokládat snížení kyselosti vín přirozenou cestou (vytlačení vinného kamene a jablečno-mléčná fermentace). K přeměně kyseliny jablečné je možné využít bakterii kmenu *Oenococcus oeni* na jemnější kyselinu mléčnou a oxid uhličitý. K odkyselování se také využívají uhličitán vápenatý a hydrogenuhličitán draselný, které reagují s kyselinou vinnou, nikoliv však s kyselinou jablečnou. Poté se nechají usadit sedimenty (odumřelé kvasinky) a víno se stačí do jiné nádoby. Následně je třeba víno vyčistit od bílkovin pomocí čířících prostředků, jako je např. bentonit, želatina nebo vaječný bílek. Platí, že čím je nižší pH vína, tím lépe probíhá proces číření. Usazené sraženiny se odstraní filtrací. Poté probíhá zrání vína (2-3 roky) v dubových sudech nebo tancích. Hotová vína se lahvuji [11, 41, 60].

2.2.2 Produkční systémy ve vinohradnictví

2.2.2.1 Ekologická produkce vína

Moderní pěstování révy vinné směřuje stále častěji k ekologickým systémům hospodaření. Má za cíl respektovat vinici jako celek i vzájemné vztahy v rámci tohoto ekosystému. Počátky ekologického vinařství můžeme nalézt už v padesátých letech minulého století ve Švýcarsku a Německu. Masivnější rozvoj však nastal až v sedmdesátých letech [44, 46].

Základní požadavky na produkci biovína v Evropě vydává Evropská unie. Pěstování a výroba vína musí odpovídat platné legislativě a v České republice je kontrolována inspekční a certifikační organizací pro ekologické zemědělství z pověření Ministerstva zemědělství ČR. Experti z členských států EU schválili dne 8. 2. 2012 na zasedání Stálého výboru pro ekologické zemědělství legislativu, která definuje biovíno a ustanovuje soubor vinařských postupů a látek. Dříve neexistovala legislativa definující biovíno. Na etiketě mohlo být pouze uvedeno „víno vyrobené z ekologických hroznů“, protože jen organicky produkované hrozny

mohly být certifikovány. Momentálně jsou však regule nastaveny a v dubnu roku 2012 začne první oficiální prodej těchto vín. Čeští vinaři prozatím zůstávají opatrní a spíše skeptičtí ke vzniku výhody z používání označení *biovino*. Příkladem jednoho z nových pravidel je, že hladina siřičitanů v biovině musí být o 30-50 mg na litr nižší než v jeho běžné podobě. Je však také možnost pružně toto nařízení upravovat pro méně příznivé oblasti střední a severní Evropy. Vinaři, kteří splní pravidla ekologické produkce tak budou moci své výrobky označovat jako *bio* a používat logo EU pro ekologickou produkci [42, 43, 44, 48, 67].

Principem ekologického pěstování révy je striktní používání čistě přírodních látek místo syntetických přípravků na podporu růstu, např. snadno rozpustitelná minerální hnojiva nebo přípravky pro jejich ochranu, tj. pesticidy (insekticidy, herbicidy, fungicidy, akaricidy). Místo pesticidů se k hubení parazitických škůdců používají např. draví roztoči, slunéčka nebo bakterie. Škůdci většinou žijí v zeleni mezi řádky vinohradů. Dalšími klasickými nástroji jsou strašáci či lapače matoucí samečky obalečů. V případě, že rostlinu napadne plíseň, lze použít v patřičném množství měďnaté a sirnaté prostředky. Takovéto procesy výroby bez přidání umělých přísad probíhají déle a jsou pracnější. Pracnější bude i skladování takového produktu. Nesmí se používat šlechtěné kvasinky, enzymy a další syntetické látky. Ekologická produkce klade požadavky také na přídavné látky zemědělského původu, jimiž jsou např. cukr a koncentrát hroznového moštu [42, 44].

Někteří ekologičtí vinaři ve svém snažení o ekologizaci své produkce došli až daleko, že se snaží používat materiály z recyklovaných materiálů, investují do efektivního využívání energií a vhodných druhů přepravy svých produktů (minimální využívání letecké dopravy). To vše přispívá ke zlepšení produkce vína ze všech uhlů pohledu, jak z pohledu kvality složení, tak i z pohledu odpovědnosti za vyráběný produkt ve vztahu k okolí [44].

2.2.2.2 Integrovaná produkce

Na rozdíl od intenzivní chemické ochrany, která se prosazovala v nedávné době, vzniklo ještě hnutí, které prosazuje ekologické hospodaření zcela bez chemického hospodaření. Oba tyto extrémy jsou nevýhodné, protože v prvním případě je poškozován ekosystém a v druhém případě jsou výnosy až o třetinu nižší. Kromě toho, je také ekologické pěstování velice náročné. Řešení nabízí tzv. integrovaná produkce vína. Ta spočívá ve využívání preventivních a přímých opatření bránící vzniku a rozšíření chorob a rozmnožení živočišných škůdců. V praxi to znamená, že při ochraně vinné révy se kromě účinných pěstebních opatření využívají mechanické způsoby, prostředky biologické a biotechnické ochrany i tzv. usměrněnou, šetrnou, ale účinnou chemickou ochranu [46, 47].

Při tomto racionálním postupu musí být každý zásah pesticidy plně zdůvodněn, je třeba ho provést ve správnou dobu, správným způsobem a optimálním chemickým přípravkem, který musí maximálně šetřit ekosystém. Chemický přípravek by měl být specifický pro škodlivé organismy, šetrný k životnímu prostředí a zároveň maximálně účinný. Tyto prostředky nesmí obsahovat zakázané látky [42, 47].

Způsob integrované ochrany a integrované produkce prosazuje *Svaz pro integrované systémy pěstování ovoce*. Tato organizace vydává směrnice pro integrované systémy pěstování ovoce, kde je výčet povolených pesticidů. Dalším sdružením, které propaguje tento druh produkce je u nás *Ekovín (Svaz integrované a ekologické produkce vína a hroznů)*. Fakticky je nyní na jižní Moravě asi 19 tisíc hektarů vinic a z toho asi 12 tisíc hektarů obhospodařují tamní zemědělci v integrované produkci [42, 47].

Zásady a opatření využívané v integrované produkci:

- pěstování rezistentních a tolerantních odrůd,
- způsob výsadby a výběr lokality,
- uplatňování vyrovnané racionální výživy,
- mechanické odstraňování zdrojů šíření a primárních výskytů škodlivých organismů,
- uplatňování biologických a biotechnologických prostředků při ochraně,
- využívání šetrné chemické ochrany [47].

Na hektar biovinice dostanou pěstitelé v závislosti na kurzu přibližně 22 tisíc korun za rok. V případě integrované produkce je tato částka asi o třetinu nižší. Nicméně i tato finanční motivace nedokáže prozatím vzbudit zájem dostatečného množství vinařů o ekologické a integrované pěstování vína, aby se pokryla česká poptávka po biovinech a tak se musí dovážet [42].

2.2.3 Perspektivní molekulární biotechnologie ve výrobě vína

Molekulární biotechnologie je poměrně nový obor a již samotný název napovídá, že zde budou mít hlavní slovo živé organismy. Na rozdíl od klasické biotechnologie, molekulární biotechnologie využívá geneticky upravené mikroorganismy. I tyto mikroorganismy jsou využívány k tomu, aby přeměnily výchozí látku pro naše použití [8].

Ačkoliv je termín biotechnologie poměrně nedávný, mikroorganismy k produkci potravin jsou využívány staletí. Příkladem je konverze hroznového vína do podoby vína pomocí *Saccharomyces cerevisiae*, což je pravděpodobně nejstarší potvrzený příklad biotechnologie. Vývoj této vědy je odvozený z radikálního vzestupu genového inženýrství [8].

Důležitost kvasinek a bakterií ve výrobě vína je obecně známa, proto je snaha o tvorbu takových postupů, při kterých budou organismům upraveny jejich vlastnosti pomocí modifikace jejich genetické informace. Lze takto mnohem snadněji kontrolovat jejich aktivitu a chránit je před vnějšími podmínkami. Bylo zjištěno, že některé mikroorganismy je možné geneticky modifikovat natolik, že se zlepší jejich vlastnosti z hlediska životnosti buněk, zvýší se výnosy ze zkvasitelných cukrů a zlepší se asimilace dusíku. Také může dojít ke zvýšení odolnosti vůči antimikrobiálním přípravkům, sníží se tvorba pěny a zlepší se flokulační schopnosti [8, 14].

Jistě, lze polemizovat nad otázkou etiky, jelikož obecně otázka genetického inženýrství je velmi citlivá. Také se často stále preferuje názor, že za převážnou kvalitu vín je zodpovědná odrůda, její zralost a teplota fermentace. Zatím se však příliš neuvažuje o využití geneticky modifikovaných mikroorganismů v průmyslové praxi, protože výroba vína je oblastí poměrně konzervativní, a proto, jak už to obecně u konzervativní potravinářské výroby bývá, je těžké nová zlepšení implementovat [8, 14].

I když se geneticky modifikované organismy prozatím nevyužívají ve vinařském průmyslu, jsou součástí právních vztahů a úprav, které vznikly na základě použití technologie rekombinantní DNA k produkci geneticky modifikovaných rostlin a živočichů u jiných potravin. Je nutné zavést opatření vůči importu vín, která by mohla být vyrobena takovýmto způsobem. Vědci v USA v současnosti zkouší nový kmen geneticky modifikované kvasinky značený ML01 v komerčním prostředí a autorizovaný je jen v USA. Tamní legislativa bere kvasinky jako procesní činidlo, není tedy třeba žádné osvědčení o užívání GMO. V USA se také zkouší geneticky modifikovat hrozny, kdy se u nich zkouší např. včlenit geny pro rezistenci na pesticidy. V EU se tyto pokusy na hroznovém víně zastavily poslední zkouškou v roce 2005 opět z obav a politického tlaku [14, 26].

Americkou organizací byl schválen geneticky upravený druh *Saccharomyces cerevisiae* jako bezpečný pro naše zdraví (General Recognised as Safe - GRAS) v roce 2003. Tomuto druhu byly vloženy geny z bakterií mléčného kvašení umožňující přeměňovat kyselinu jablečnou v kyselinu mléčnou bez použití těchto bakterií. Jablečno-mléčná fermentace je obvykle problematická, protože se bakteriím příliš nedaří v prostředí alkoholu. Alkoholová a jablečno-mléčná fermentace může probíhat současně, přičemž může být řízena jednou a tou samou rekombinantní kvasinkou [14, 26].

Principiálně jsou vlastnosti mikroorganismů kontrolované jedním nebo několika málo geny, které lze snadno modifikovat. Příkladem může být inaktivace genu, který kóduje sulfidovou reduktázu, což sníží celkovou tvorbu sirovodíku kvasinkami. Oproti tomu lze uvést příklad složitějšího způsobu genetické intervence, tím je zesílení precipitace (flokulace) na konci fermentace. Flokulace je regulována několika geny, které jsou řízeny tzv. epistatickými geny a některými cytoplazmatickými genetickými faktory. Rovněž také důležité výrobní podmínky a vlastnosti kvasinek jako je alkoholová tolerance a schopnost fermentace při nízkých teplotách je řízena více geny [8].

K modifikaci organismů, resp. k modifikaci metabolické funkce, lze v současnosti použít mnoho technik, z nichž většina je tedy založena na transformaci, tj. začlenění genu genetickým inženýrstvím. Jednodušší však může být možnost, kdy se inaktivují geny a tak není nutné nic složitě měnit v genetické výbavě. Také se využívá toho, že metabolické dráhy často používají zpětnovazebnou inhibici k regulaci metabolismu. Když se však tato regulace eliminuje, může být zajištěna tvorba většího množství konečného produktu [8].

Výzkumníci, kteří se angažují ve zlepšování vlastností vinných kvasinek i jiných mikroorganismů mají i další metody k dispozici. Nejjednodušší procedura zahrnuje přímou selekci kmenů vlastních požadované znaky či vlastnosti. Úspěch takovéto metody závisí na jednoduchosti, se kterou přítomnost takovýchto znaků může být identifikována i izolována. Izolace je usnadněna, jestliže použité selektivní kultivační médium umožňuje růst jen těm buňkám vlastním určité znaky. V genetickém inženýrství je požadovaný gen typicky kombinován s dalšími, jako je gen pro antibiotickou, herbicidní toleranci či toleranci pro těžké kovy. Následnou aplikací inhibitoru do růstového prostředí se potlačí růst či jsou zabity buňky, kromě těch, které disponují rezistentním/tolerančním genem. Poté se buňky izolují a je nutné u nich ověřit, zda mají požadované atributy [8].

U organismů, které se rozmnožují pohlavně (např. *S. cerevisiae*) lze aplikovat také metody jako je hybridizace, backcrossing nebo mutagenese [8].

2.3 Mikroorganismy významné pro výrobu vín

Různorodost mikroorganismů ve víně je ohromná. Signifikantní význam mají kvasinky a kvasinkové mikroorganismy, grampozitivní mléčné bakterie a některé druhy vláknitých hub [6].

Bakterie jsou součástí přirozené mikroflóry hroznů, moštů a vín. Mohou být užitečné, tzn. přispívají k vyšší kvalitě vína, protože v něm vyvolávají jablečno-mléčné kvašení anebo mohou být škodlivé a vytvářet ve víně nezvratné negativní změny [7].

Plísňe jsou mikroorganismy, které s kvasinkami a bakteriemi vytvářejí mikroflóru vinné révy a hroznů během vegetace. Mohou se také vyskytovat na stěnách vinných sklepů, sudů a vinařských zařízení. Jejich výskyt je také v neodborně ošetřovaných dřevěných nádobách na víno [7].

Z vinařsko-technologického hlediska, zejména však z hlediska kvasno-fyziologického jsou naprosto nejdůležitější kvasinky a proto, máme-li v plánu produkovat kvalitní víno, je bezpodmínečně nutné znát jejich detailní specifikaci [6].

2.3.1 Úvod do světa kvasinek

2.3.1.1 Zařazení a obecná charakteristika vinných kvasinek

Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganizmy, které řadíme mezi vyšší houby. Je přijímána hypotéza, že kvasinky jsou redukovanými formami hub. V systému hub (latinsky *Fungi*) patří mezi vlastní houby (*Eumycota*) a do dvou velkých pododdělení:

- Vřeckovýtrusé houby (*Ascomycotina*)
- Stopkovýtrusé houby (*Basidiomycotina*) [20].

Tato zmíněná pododdělení se rozšiřují ještě o pododdělení *Deuteromycotina* pro anamorfní kvasinky, u nichž je dokázána absence pohlavního rozmnožování a o pododdělení *Endomycetes*, do kterého se řadí velká část kvasinek vřeckovýtrusných hub, které vytváří primitivní asky, netvoří plodnice a askogenní hyfy [20].

Kvasinky jsou zpravidla jednobuněčné mikroorganizmy charakteristické tím, že se rozmnožují převážně pučením a zdroje uhlíku jsou využívány nejčastěji kvašením. Při pučení vzniká pupen na mateřské buňce, který se postupně zvětšuje až do okamžiku fragmentace všech buněčných organel, kdy se část organel stěhuje do pupene. Zúženina mezi mateřskou buňkou a pupenem se postupně uzavírá plazmatickou membránou a buněčnou stěnou a vzniklá dceřiná buňka se odděluje. Proces pučení se může opakovat asi 35krát, přičemž pokaždé na povrchu zůstane jizva. Na jizvě dochází ke snížení látkové výměny, proto kvasinky s řadou jizev mají nižší kvasný výkon. Podle místa, kde pupen na povrchu buňky vzniká, můžeme pučení rozlišit kvasinky:

- monopolární,
- bipolární,
- multipolární [20, 56].

Nedojde-li však k oddělení dceřiné buňky od mateřské, vzniká tzv. pseudomycelium. Někdy se lze setkat se situací, kdy kvasinky vytváří mycelia, což je příklad více buněčné formy výskytu kvasinek. S tím souvisí i změna rozmnožování z pučení na tzv. přehrádečné dělení, které se vyskytuje právě v okamžiku, kdy kvasinky rostou ve formě mycelia [20].

Pro svoji existenci potřebují kvasinky dostatek vody, přítomnost kyslíku a živin a optimální teplotu. Kvasinky se dělí podle teploty, ve které jsou schopny se množit na psychrofilní (0 - 20 °C), mezofilní (25 - 40 °C) a termofilní (50 - 110 °C). Většina z nich není xelotolerantní, což je schopnost tolerovat nižší aktivitu vody a růst za zvýšeného osmotického tlaku prostředí. Výjimku tvoří např. kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*, které tolerují vodní aktivitu o hodnotě $a_w = 0,62 - 0,67$. Dostupnost kyslíku je naprostou nezbytností pro všechny kvasinky. Proto se také můžeme setkat se dvěma skupinami kvasinek:

- Fakultativně anaerobní

Převážná část fakultativně anaerobních kvasinek je i za aerobních podmínek nastavena na režim kvašení. Respirace, kde substrátem je glukóza, tvoří asi jen 10 % uhlíkatého metabolismu. U jiných typů substrátu se toto číslo může měnit. Typickými zástupci jsou např. *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* či rod *Brettanomyces*

- Obligatorně aerobní

Typickými zástupci této skupiny jsou kvasinky, které nevlastní enzym alkoholdehydrogenázu, tudíž nemohou fermentovat a tvořit ethanol. Zástupci této skupiny kvasinek jsou např. *Rhodotorula*, *Saccharomycopsis*, *Cryptococcus* nebo *Lipomyces* [20].

2.3.1.2 Kvasinková buňka a její struktura

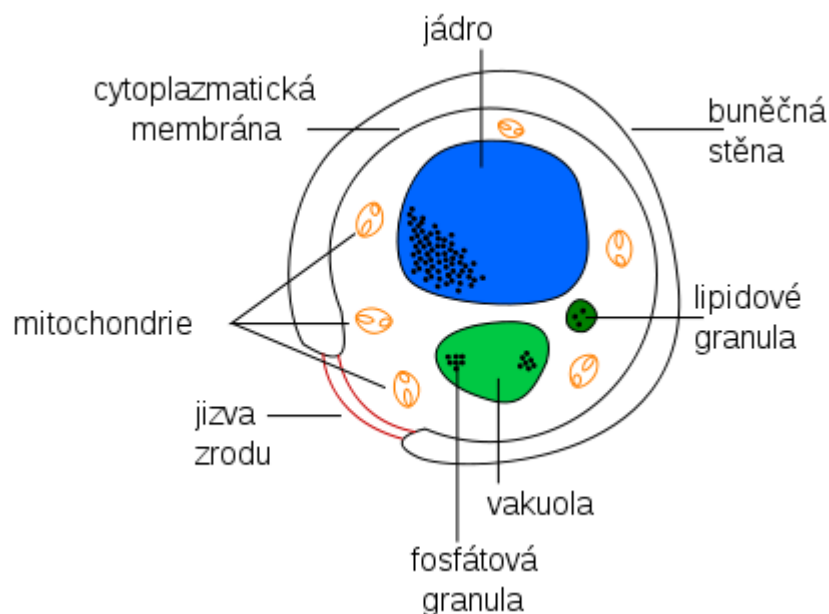
Buňky kvasinek mají velikost okolo 3-15 μm , tzn. že jsou větší jak bakteriální. Tvar buněk je z velké části ovlivněn způsobem rozmnožování, tj. pučením. Hlavním znakem kvasinek je, že jejich buňka má silnou buněčnou stěnu, která jí umožňuje odolávat změnám v osmotickém tlaku, které se mohou vyskytnout v extracelulárním prostředí. Uvnitř buněčné stěny je periplazmatický prostor a plazmatická membrána obklopující cytoplazmu. Různé transportní mechanismy kontrolují propustnost těchto struktur a udržují jejich funkci bariéry [20, 39].

Kvasinky mají mnoho organel charakteristických pro eukaryotickou buňku. Mezi tyto organely patří jádro obklopené jadernou membránou, hladké a drsné endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie a vakuoly. Cytoplazma obsahuje mnoho enzymů vyskytujících se v metabolismu. Příkladem může být enzym zodpovědný za alkoholovou fermentaci [39].

I když některé kvasinky mají málo mitochondrií, tak i přesto hrají tyto organely základní a klíčovou roli v metabolismu. Během fermentace vysoká koncentrace glukózy inhibuje syntézu enzymů, které jsou zapojené do citrátového cyklu a také cytochromy z dýchacího řetězce známým fenoménem zvaným jako glukózová represe. Výsledkem je omezení aerobního metabolismu při těchto podmínkách. Nicméně aerobní metabolismus, který je závislý na mitochondrii, se vyskytuje během produkce komerčních kvasinek využívané pro inokulaci moštu a také během některých fází výrobního procesu vína [39].

Vakuoly jsou další významnou organelou. Jsou nepostradatelné pro udržení homeostázy, což je vnitřní rovnováha. Tato organela obsahuje ve svých strukturách enzym, který se účastní degradace či obnovy buněčných složek. Také se zde akumulují metabolity, jako jsou např. aminokyseliny, S-adenosylmethionin, polyfosfát, allantoin a allantóát v mnohem vyšší koncentraci než se nachází v cytoplazmě [19, 39].

Pohybové orgány, bičíky, se u kvasinek nevyskytují, s výjimkou některých rodů kvasinek vytvářejících pohlavní spory [19].



Obr.2: Kvasinková buňka [40]

2.3.1.3 Průmyslově významné kvasinky

Kvasinky velmi často nachází uplatnění v průmyslové výrobě. Mohou být využívány jako producenti alkoholických nápojů, biomasy nebo mohou produkovat mnoho metabolických produktů. Metabolickými produkty mohou být enzymy, vitaminy, polysacharidy, karotenoidy, lipidy, glykolipidy, kyselina citrónová, ethanol, oxid uhličitý a mnoho dalších produktů vzniklých zaváděním rekombinantní DNA do kvasinek. Některé z těchto produktů jsou využitelné komerčně, zatímco jiné mohou být využity v biotechnologii [21].

Je známo, že technologické využití kvasinek se datuje do dávné minulosti. Ony začátky se datují již do doby, kdy staří Sumerové vyráběli pivo, v Asýrii se vyrábělo víno a v Římě zase vznikala pekařství. Zajímavostí je, že i výroba kefiru je známa mnoho set let, kdy první záznamy o tomto nápoji jsou z Asie. Na produkci kefiru se využívala kvasinka *Kluyveromyces* [21].

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* vždy byla dominantní druh z hlediska využívání při výrobě potravin. V současnosti se však začínají prosazovat i dříve opomíjené kvasinky. Důvodem je vědecký pokrok a zjištění, že vlastnosti, které tyto mikroorganismy vlastní, mohou být využity v různých technologických procesech, což může vést k usnadnění výroby. Moderní biotechnologie využívající kvasinky reprezentuje rozsáhlý sektor, jehož hodnota se pohybuje okolo 70 miliard dolarů ročně. Konzumenti kvasinek a kvasinkově založených produktů požadují kontinuální zlepšení kvality a ekonomiky. Z tohoto důvodu jsou kvasniční technologové pod ohromným tlakem, protože musí svoji invenci směřovat k zesílení výkonnosti kvasničních kmenů. Tudíž se možná s geneticky upravenými kvasinkami v průmyslu budeme shledávat častěji [23].

Tab. č. 2: Kvasinky pro průmyslové využití [20].

Kvasinky využívané pro technologické účely	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Výroba piva, vína, ethanolu a droždí.
<i>Candida utilis</i>	Produkce krmné biomasy.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Produkce β -galaktosidasy pro utilizaci laktózy.
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Štěpení škrobu ve směsných kultivacích.
Kvasinky pro mléčné výrobky	Například <i>Candida kefir</i> pro výrobu kefiru.
Kvasinky k produkci cizorodých proteinů	Kvasinky nesou heterologní geny pro tvorbu proteinů. Zástupci jsou <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a methylotrófní kvasinky.
Pivovarské kvasinky	Spodní a svrchní kvašení při výrobě piva.
Vinařské kvasinky	Kvasinky odolné k ethanolu a k SO ₂ . Autolýza kvasinek vytváří buket vína.
Lihovarské kvasinky	Vysoká odolnost k ethanolu a osmotolerance při výrobě lihu pro utilizaci koncentrovaných melas.
Pekařské kvasinky	Splnění požadavků na rychlé množení pro tvorbu biomasy a co nejnižší sklon k fermentaci - musí převažovat respirace.
Kvasinky štěpící škrob	Produkce amylolytických enzymů kvasinkami <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> , <i>Schwanniomyces occidentalis</i> , <i>Lipomyces kononenkoae</i> .
Kvasinky štěpící dřevní hmotu	Utilizace celulózy (<i>Aureobasidium</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Geotrichum</i>) a xylanů (<i>Candida utilis</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Trichosporon</i>).
Kvasinky využívající odpadní substráty	Například <i>Kluyveromyces lactis</i> využívající laktózu v syrovátce.
Kvasinky využívající n-alkany	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Pichia</i> , <i>Trichosporon</i> .
Kvasinky využívající methanol	Methylotrófní kvasinky (<i>Pichia</i> , <i>Hansenula polymorpha</i> , <i>Candida boidinii</i>).

2.3.2 Vliv kvasinek na celkový charakter vína

Tím, že pochopíme vliv kvasinek na klíčové vlastnosti vína, tzn. aroma, chuť a barvu, můžeme následně vyselektovat ty kmeny, které budou nejvhodnější pro vývoj nových startovacích kultur a řízení alkoholové fermentace. Kvasinky ovlivňují složení vína různými mechanismy, kterými jsou:

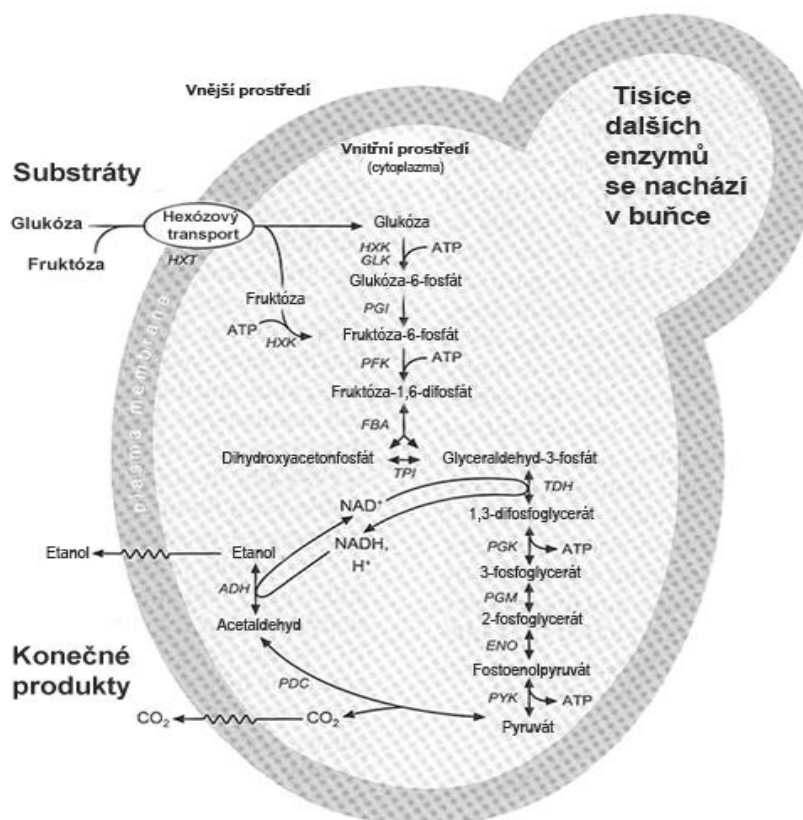
- vlastní metabolismus,
- enzymatická hydrolýza komponent hroznů,
- autolýza a bioadsorbce [9].

2.3.2.1 *Metabolismus kvasinek*

V přírodních podmínkách převládá metabolismus aerobní a v procesu výroby vína anaerobní metabolismus, které jsou ještě posíleny aplikací oxidu siřičitého, který inhibuje druhy s aerobním metabolismem. Důvod změn metabolismu kvasinek souvisí s podmínkami na přírodních stanovištích (půda, orgány hroznového vína) a ve zpracovávaném moštu. Tyto rozdíly jsou především v nižším výskytu cukerných zdrojů v přírodních stanovištích oproti podmínkám vinařské výroby, kde mají kvasinky k dispozici značné množství sacharidového substrátu v podobě šťáv (mošt, sladké víno atd.). Mimo jiné existuje také podstatný rozdíl k expozici kyslíku, kdy v přírodních podmínkách je většinou k dispozici vysoký obsah kyslíku, což je tedy opačný stav k situaci v moštech a vínech [6].

Hlavními sloučeninami, které mají dopad na chuť, aroma a barvu jsou cukry, dusíkaté látky, organické kyseliny, glycerol, vyšší alkoholy, estery, aldehydy, ketony, aminy a sloučeniny síry. Mnoho studií zaznamenalo kvalitativní a kvantitativní profil těchto metabolitů pro různé kmeny *saccharomycetních* a *ne-saccharomycetních* kvasinek. Tyto profily se významně liší mezi kmeny a je třeba vyselektovat ty kmeny disponujícími vlastnostmi, jež jsou buď pozitivní efekt (zvýšení produkce ethanolu, zesílení tvorby esterů) nebo negativní efekt (nadprodukce kyseliny octové nebo hydrogensulfidů) [9].

Nejdůležitějším procesem charakteristický pro každý nápoj s obsahem ethanolu je alkoholové kvašení (fermentace). Tvorba ethanolu je součástí metabolismu cukrů kvasinek, konkrétně tzv. anaerobní glykolýzy, která probíhá nejlépe při teplotě 28 – 35 °C a pH 3,5 – 6. Glykolýza je sled reakcí přeměny glukózy přes řadu hexózafosfátů a triózafosfátů na pyruvát. Probíhá buď za aerobních nebo anaerobních podmínek. V případě aerobních podmínek je většina pyruvátu přeměněna na acetyl-CoA, který poté vstupuje do citrátového cyklu. Pro výrobu vína je však mnohem důležitější anaerobní přeměna pyruvátu, kdy je přeměněn přes acetaldehyd právě na ethanol. Přeměna acetaldehydu na ethanol je umožněna reoxidací $\text{NADH} + \text{H}^+$ na NAD^+ , který se opět může zapojit do oxidace glycerinaldehyd-3-fosfátu na 1, 3-difosfoglycerát. Při této reoxidaci kromě vzniku ethanolu vznikají dva moly ATP. Sled reakcí je možné vidět na obr. 3. Je nutné, aby i při anaerobní glykolýze, bylo malé množství kyslíku poskytnuto kvasinkám pro biosyntézu polynenasycených tuků a lipidů [52, 59].



Obr. 3: Schéma alkoholové fermentace v kvasinkové buňce [22]

2.3.2.2 Enzymatická hydrolyza komponent hroznů

Enzymatická výbava kvasinek může být velmi pozitivní pro aktivaci látek, které přispívají k charakteru vína. Příkladem mohou být glykosidázy, které dokáží přerušit kovalentní vazbu mezi monoterpeny a glukózou, popř. disacharidem, které se přirozeně nachází v bobulích. Přerušením kovalentní vazby dojde k uvolnění těkavých monoterpenů, které následně významně mohou přispívat k celkovému senzorickému profilu vína. Mezi zástupce aromatických monoterpenů vína patří citronellol, geraniol, linalool a nerol [9].

Stejným způsobem kvasinky významně zesilují koncentraci těkavých thiolů (4-merkapt-4-methylpentan-2-on, 3-merkaptohexan-1-ol a 3-merkaptohexyl acetát). Tyto tioly poskytují aroma grepů, citrusů a jiných ovocných látek tolik specifických pro různé druhy vín. Tioly se vyskytují v bobulích jako netěkavé sloučeniny, které jsou spojeny s cysteinem. Během fermentace kvasinky produkují, cystein lyázu, která dokáže rozštěpit vazbu, čímž se tioly uvolní. Schopnost uvolňovat tioly není u všech kvasinek stejná. Proto jsou vhodné ty, které mají schopnost uvolňovat tioly, tak i terpeny. Kvasinky mají k dispozici širokou škálu enzymů. Z nich lze uvést esterázy, dekarboxylázy, sulfid reductázy, proteázy a pektinázy, které mají také dopad na charakter vína [9].

2.3.2.3 Autolýza a bioadsorbce

Role autolýzy a bioadsorbce kvasinek není příliš prostudována. Budoucí vývoj v oblasti vinařské vědy bude jistě směřovat i do této oblasti. Během alkoholové fermentace se nám

radikálně zvětší množství buněčné biomasy, která se skládá z mrtvých i živých buněk rozdílných kmenů a druhů. Odumřelé buňky kvasinek autolyzují, kdy dochází k enzymatické degradaci buněčných proteinů, nukleových kyselin a lipidů na konečné produkty jako jsou aminokyseliny, peptidy, mastné kyseliny, nukleotidy a uvolněné rozpustné mannoproteiny z buněčné stěny. Všechny tyto látky přispívají k celkovému aromatu. Uvolňované peptidy mají mimo jiné funkci antioxidantů a bioaktivních látek [9].

Buňky kvasinek jsou obaleny buněčnou stěnou, která může tvořit až 30 % hmotnosti sušiny. Buněčná stěna je složena převážně z glukonových polysacharidů a manoproteinů. Které mají potenciál upravovat chuť vína bioadsorpcí hroznových komponent, včetně mykotoxinů a mikrobiálních metabolitů. Bioadsorpční vlastnosti manoproteinů se jeví jako zvláště významné a přispívají ke koloidní stabilitě vína interakcí s vinanem a proteiny [9].

2.4 Identifikace kvasinek

Mezinárodní konkurence ve vinném průmyslu se zvyšuje s rostoucím zájmem zákazníka o nové typy vín a také o environmentální aspekty produkce vína. Do konce osmdesátých let platila teorie, že kvasinky přispívají ke kvalitě vína minimálně. Vědělo se, že nejvýznamnější kvasinka je *Saccharomyces cerevisiae*, která se také izolovala a vyvíjela se z ní startovací kultura pro fermentaci vína. Známé byly také další druhy kvasinek, o nichž se vědělo, že mají význam v rané fázi fermentace, avšak uvažovalo se, že jejich význam je nízký nebo naopak mohou kvalitu vína snižovat. Proto se také vhodnou inokulací správné startovací kultury a přidavkem oxidu siřičitého zbytek kvasinek raději eliminoval [9].

V posledních 25 letech se však trend poněkud mění. Připouští se fakt, že je naprosto nevyhnutelné pochopit ekologii, fyziologii, biochemii a molekulární biologii kvasinek, které se vyskytují ve víně a mají různě velký dopad na finální produkt. Znalost o druzích kvasinek zapojených do alkoholové fermentace a rychlost jejich růstu v průběhu fermentace jsou nezbytné kroky pro pochopení jejich dopadu na kvalitu vína a také pro vývoj dalších směrů [9].

Pod pojmem kvasinky si většina lidí představí mikroorganismy spojené s výrobou alkoholických nápojů. Tato obecná představa není zcela přesná, ale v průmyslové praxi je převažující. Optimální kvasinky jsou přitom takové, které jsou schopny efektivně a úspěšně fermentovat cukr na ethanol a být také vůči tomuto ethanolu tolerantní, přičemž bylo zjištěno, že alkoholová fermentace je zpravidla nejvíce ovlivněna jedním či velmi málo rody *Saccharomyces*. Identifikace na kmenové úrovni je primárním krokem k pochopení biodiverzity kvasinek a také k dynamice změn v populaci kvasinek během fermentačního procesu [3, 16, 17].

Lze říci, že před 50-70 lety byla většina vín produkována tzv. spontánní nebo přírodní alkoholovou fermentací hroznového vína kvasinkami, které byly původní, tzn. vyskytovaly se již dříve na bobulích určených ke zpracování a také se mohly na procesu kvašení podílet kvasinky původem ze vzduchu či z povrchu nástrojů, které přišly do kontaktu se šťávou určenou k fermentaci [3].

V průběhu let se zjistilo, že hlavní kvasinky podílející se na procesu fermentace jsou *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. Tyto kvasinky jsou zajímavé tím, že jsou kryotolerantní, tzn. že je možné je použít pro fermentace při nízkých teplotách při zachování dobrých schopností uvolňovat látky prospěšné pro aroma vína. V současnosti mnoho výrobců vína kupuje komerční kvasinky v sušeném stavu pro inokulaci vinné šťávy a zahájení alkoholové fermentace. Nicméně to je podmíněno znalostí o tom, jaké druhy kvasinek se v průběhu

kvašení ve šťávě vyskytují vždy a kooperují nebo soutěží s jinými druhy o sacharidický substrát [3, 16].

2.4.1 Kvasinkový profil v průběhu cyklu výroby vín

Bylo zjištěno, že velmi málo kvasinek se nachází na nezralých bobulích a jejich počet se zvyšuje ke konci dozrávání, kdy se již chystají ke sklizni. Je nutné si však uvědomit, že výskyt různých společenství kvasinek na hroznech závisí ve značné míře na ekologických podmínkách vinice. Variabilita a zastoupení druhů kvasinek je dáno dlouhodobým složitým procesem adaptace na různé faktory (půdní a klimatické podmínky). Na kvalitativní a kvantitativní složení mají vliv i biologické zásahy člověka, např. aplikací pesticidů k ochraně vinic. Bylo zjištěno, že kvasinkový profil se může lišit s každým novým rokem. Původní kvasinková flóra vinic zabezpečuje spontánní kvašení moštu a toto kvašení může být v různých oblastech dosti rozličné v zastoupení rodů a druhů kvasinek, jak po stránce kvalitativní, tak kvantitativní. Kvasinkový profil lze posuzovat třífázovým způsobem z hlediska stupně výroby [3, 6, 16].

Z vinice přichází jen 1 až 3 % požadovaných kvasinek. Převážně se jedná o 16 různých kmenů kvasinek, z nich ale jen pět kmenů je schopno zcela prokvasit mošt. Nejjednodušším způsobem můžeme kvasinky rozdělit na dobře kvasící, slabě kvasící, křísotvorné a sporadicky se vyskytující. Dobře kvasící kvasinky vytvářejí hodně alkoholu a hodně pozitivních vedlejších produktů. Označují se jako ušlechtilé a patří do druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Slabě kvasící se v moštu nachází přirozeně a označují se jako divoké. Na počátku kvašení mají asi tisíckrát vyšší zastoupení než *Saccharomyces cerevisiae* a zahajují kvašení. Mají malou toleranci k alkoholu, avšak mohou vytvářet pozitivní vedlejší produkty jako je glycerol. Křísotvorné kvasinky vyžadují přístup kyslíku a vínu škodí [56].

2.4.1.1 Hrozny a kvasinkový profil

Obecně se však uvádí, že nezralé hrozny obsahují převážně kvasinky rodu *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus* a *Candida*. Mezi těmito rody se objevuje také vláknitá houba *Aureobasidium pullulans*. Většina z těchto rodů se také vyskytuje na zralých plodech, kde se k nim mohou připojit druhy *Hanseniaspora* (anamorfní forma *Kloeckera*) a *Metschnikowia*. Rozrušením bobulí a s tím souvisejícím přístupem k lehce zkvasitelným cukrům vzrůstá populace *Hanseniaspora* a *Metschnikowia* včetně dalších rodů zahrnujících *Saccharomyces* a *Zygosaccharomyces* [3].

2.4.1.2 Vinný mošt a kvasinkový profil

Čerstvě vyextrahovaná vinná šťáva v sobě ukrývá populace kvasinek složené převážně z rodu *Hanseniospora*. Mohou se ale vyskytovat i další rody, jako např. *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia* a *Kluyveromyces*. Šťáva také obsahuje nízkou koncentraci kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae*, kde jejich množství je dáno rozšířením na původních hroznech a pracovních nářadích během celého procesu zpracování šťávy. Příležitostně lze nacházet i tyto rody: *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Tolurasporea*, *Dekkera* a *Schizosaccharomyces*. Vliv na kvasinkovou flóru moštu může mít tedy i znečištění výrobního zařízení, dodržování hygieny a sanitace sklepa nebo výrobních prostor. Je tedy logické, že budeme-li postupovat dále v procesu výroby vín, na každém z těchto úseků hrozí jiná kontaminace [3, 6, 9].

2.4.1.3 Fermentace a kvasinkový profil

Fermentace je zahájena růstem různých druhů, které nepatří do rodu *Saccharomyces* (např. *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Candida colliculosa*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Kluyveromyces thermotolerans*). V podstatě bývá pravidlem, že tato fermentace bývá prováděna v tomto populačním spektru po čtyři dny, kdy přibližně po této době dochází k rychlému odumření všech kvasinek nepatřících do rodu *Saccharomyces* vlivem zvyšující se koncentrace alkoholu, který je dodáván rodem *Saccharomyces*. Do této doby byla *Saccharomyces* v nízké populaci oproti všem ostatním. Důležité je však to, že množství biomasy z těchto eliminovaných kvasinek má uspokojivý dopad na chemické složení vína a celkový příspěvek těchto kvasinek k celkovému charakteru vína. Někdy lze však pozorovat, že za určitých podmínek, jako je např. fermentace za nízkých teplot, se kvasinky nepatřící do rodu *Saccharomyces* vyskytují po celý průběh fermentace ve vysokých populacích [3, 9].

Mnoho faktorů jako je složení vinného moštu, rezidua pesticidů, přídavek oxidu siřičitého, koncentrace rozpuštěného kyslíku, akumulace ethanolu a teplota ovlivňující kinetiku kvasinkového růstu během fermentace vína. Málo se však ví o tom, jak tyto faktory mohou ovlivňovat dominanci nebo sukcesi jednotlivých rodů v rámci celkové populace. Klíčový faktorem však stále zůstává koncentrace ethanolu, kdy jednotlivé kvasinky se liší podle své senzitivity k této sloučenině. Zajímavé je zjištění, že se porušilo tabu největší odolnosti vůči ethanolu kvasinkou *Saccharomyces*, protože se podařilo izolovat druhy kvasinek, které mají stejnou toleranci k alkoholu jako *Saccharomyces*. Jedná se o rody *Hanseniaspora*, *Candida*, a *Kluyveromyces*.

Kromě ethanolu a jiných zmiňovaných faktorů, existují další faktory ovlivňující interakci mezi kvasinkami, jsou jimi tzv. *killer* faktor a *quorum-sensing* [9].

Bylo zjištěno, že existuje vysoká rozmanitost v rámci druhu, tzn. jeden druh obsahuje mnoho kmenů. Lze z toho soudit, že kvašení přesně reflektuje onen zmíněný ekologický vliv a také biochemickou a metabolickou rozmanitost, tzn. že různé rody, ba dokonce i různé kmeny mohou produkovat různé produkty jako např. organické kyseliny, vyšší alkoholy, estery a další těkavé látky [3].

V posledních fázích fermentace se výskyt jednotlivých rodů zúžuje jen na rod *Saccharomyces*, který danou fermentaci již dokončí. Jedná se o *S. cerevisiae*, *S. bayanus* a také v ojedinělých případech *S. paradoxus*. Zvýšenou pozornost je třeba dbát na skladování vína, jelikož je víno velmi náchylné na povrchové mikroflóry a oxidační kvasinky rodu *Candida*, *Pichia* a *Hansenula*. Je nutné se chránit před rody, které jsou tzv. alkohol-tolerantní, jimiž jsou např. *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomycodes ludwigii* a *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. U nich se setkáváme s kažením chuti u vína, což má samozřejmě fatální následky na senzorickou kvalitu [3].

2.4.2 Vývoj a přehled technik pro identifikaci kvasinek ve víně

Klasické metody identifikace kvasinek zahrnují morfologické a fyziologické testy. Fyziologické testy jsou založené na schopnosti fermentovat a asimilovat rozmanité sloučeniny. Tyto testy však mohly být ovlivněny podmínkami kultivace, což mohlo vést k nesprávné identifikaci. Další pokusy, které se prováděly, byly k rozlišení kmenů v rámci druhu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pomocí elektroforetické analýzy exocelulárních proteinů, později i intracelulárních proteinů. Další týmy navrhovaly identifikovat kmeny

analýzou jejich řetězců mastných kyselin pomocí plynové chromatografie. Ačkoliv tyto různé techniky rozlišují mezi některými kmeny, jsou nezvratně méně rozlišující než genetické metody. Také tyto metody mají nevýhodu v tom, že jsou závislé na fyziologickém stavu kmenů a na podmínkách kultivace, které musí být vždy totožné [10, 65].

Na konci osmdesátých let se vlivem velkých pokroků v genetice mohli aplikovat metody, které úspěšně charakterizovaly vinné kmeny kvasinek. Všechny metody se zabývaly genetickým materiálem, což tedy mohlo eliminovat negativa spojená s výše zmiňovanými metodami [18].

Analýza složení bází DNA plynovou chromatografií, DNA reasociace, mitochondriální DNA-RFLP, PCR-RFLP, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeats), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), SSCP (single-strand conformation polymorphism), analýza genové sekvence (ITS) a (D1/D2), analýza multigenové sekvence a navrhování specifických primerů je výčet různých molekulárně-biologických metod, které zlepšily identifikaci mikroorganismů. Pravdou však je, že některé z těchto metod jsou složité, časově náročné, drahé a nemůžou být použity v průmyslové laboratoři [10, 18].

K pochopení principů genetických metod je třeba znát něco o základech života, tj. genetické informaci.

2.4.2.1 Genetická informace jako klíč k identifikaci

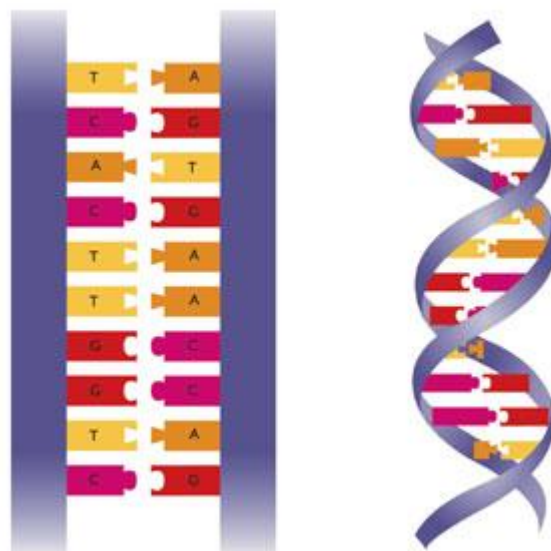
V dnešní době existuje mnoho metod a přístupů, které se principiálně snaží o charakterizaci mikroorganismů podle základních podobností a odlišností v genetické výbavě mezi sebou. Takový genetický materiál vykazuje rozdíly v nukleových kyselinách a to buď v DNA (deoxyribonukleová kyselina) nebo v RNA (ribonukleová kyselina). Nukleové kyseliny jsou biologické makromolekuly, jejichž úlohou je uchovávat a přenášet genetickou informaci v buňce. Nukleové kyseliny jsou složeny ze sacharidové složky ribózy nebo deoxyribózy, kyseliny trihydrogenfosforečné a dusíkaté báze odvozené od purinu – adenin (A) a guanin (G) nebo pyrimidinu – cytozin (C), uracil (U) a thymin (T). Ribonukleová kyselina obsahuje sacharidovou složku ribózu a dusíkaté báze A, G, C a U. Deoxyribonukleová kyselina obsahuje sacharidovou složku deoxyribózu a dusíkaté báze A, G, C, T. Sloučenina purinové nebo pyrimidinové dusíkaté báze a sacharidu se nazývá nukleosid. V případě, že jsou spojené všechny tři složky, hovoříme o nukleotidu. V nukleových kyselinách jsou nukleotidy spojené fosfodiesterovou vazbou do polynukleotidového řetězce [4, 57].

- **Struktura nukleových kyselin**

Pořadí nukleotidů v nukleových kyselinách, podobně jako pořadí aminokyselin v bílkovinách určuje jejich celkovou strukturu a vlastnosti. *Primární struktura* nukleových kyselin je určena pořadím nukleotidů v polynukleotidovém řetězci. *Sekundární struktura* DNA má tvar dvojité pravotočivé šroubovice, která je vytvořena dvěma polynukleotidovými proti sobě jdoucími tzv. komplementárními řetězci. Komplementarita znamená, že se vždy váže jedna purinová s jednou pyrimidinovou bází – guanin se váže třemi vodíkovými vazbami s cytosinem a adenin se váže dvěma vodíkovými vazbami s thyminem v DNA nebo s uracylem v RNA. Terciální struktura nukleových kyselin vzniká stočením šroubovice do tzv. superhelixu [57].

Sekvenční uspořádání bází v každém řetězci je jedinečné a vytváří „otisk prstů“ daného organismu (mikroorganismu). Identifikace unikátní sekvence nukleotidových bází uvnitř

DNA v rozsahu méně než sto až tisíce nukleotidů může sloužit jako specifický nástroj pro identifikaci mikroorganismů. Tyto techniky poskytují přímé srovnání na úrovni genu a nemusíme se tak spoléhat na detekci sekundárních produktů, kterými jsou např. metabolity či bílkoviny a kde jejich projevení může být ovlivněno buňkou [4].



Obr. 4: Pravotočivá šroubovice DNA [58]

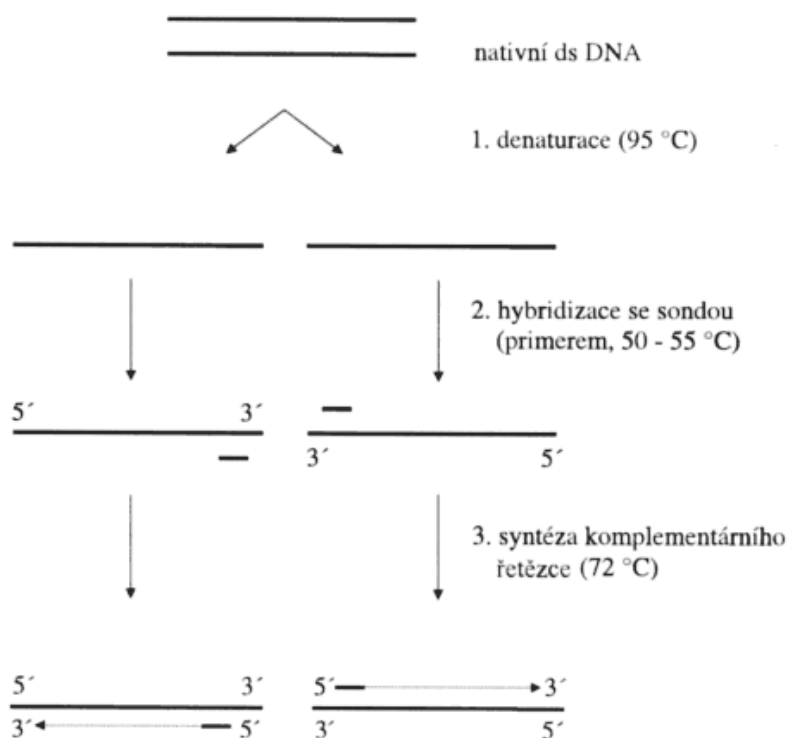
- Přenos genetické informace

Přenos genetické informace se definuje jako jednosměrný transfer genetické informace z DNA do RNA a z RNA do bílkovin. Tato definice platí pro všechny prokaryotické a eukaryotické organizmy a pro většinu virů. Existují tři hlavní procesy uchování a přenosu genetické informace. Prvním procesem je *replikace*, která zahrnuje zdvojení DNA za vzniku identických kopií. Druhým procesem je přepis respektive *transkripce*, kterou se genetická informace z DNA přepisuje do mRNA. Třetím procesem je překlad neboli *translace*, při které je genetická informace dekována a přeložena z jazyka dusíkatých bází (pořadí nukleotidů) nukleových kyselin do jazyka aminokyselin (pořadí aminokyselin) potřebných pro syntézu polypeptidového řetězce [57].

2.4.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Objevení polymerázové řetězové reakce (PCR) roku 1985 americkým biochemikem Kary Mullisem mělo obrovský význam pro molekulární biologii v oblasti analýzy a identifikace genetické informace. V roce 1993 za tento objev dostal Mullis Nobelovu cenu. Metoda se ihned rozšířila do mnoha oborů od archeologie až po kriminalistiku. V roce 1997 se také podařilo poprvé analyzovat mitochondriální DNA získanou z kostí Neandrtálce [53].

Základním principem metody PCR je replikace nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem v živých organizmech. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza prostřednictvím DNA-polymerázy. Tato syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA probíhá ve směru $5' \rightarrow 3'$. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich $3'$ - konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně [49].



Obr. 5: Polymerázová řetězová reakce (PCR) [55]

Kromě tag-polymerázy a primerů obsahuje reakční směs jako kofaktor hořčnaté ionty Mg^{2+} , které tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'- deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) rozpoznávaný DNA-polymerázou. Jelikož ionty Mg^{2+} interagují nejen s dNTP, ale i s primery, s templátovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly, je třeba stanovit optimální koncentraci iontů Mg^{2+} empiricky. Příliš vysoká koncentrace některé ze složek reakce může vést k chybám a vzniku nespecifických produktů [49].

K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. *Taq* DNA-polymeráza z bakterie *Thermus Aquaticus*, která žije v horkých pramenech Yellowstonekého Národního Parku. Tato polymeráza je schopna odolat teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu:

- Denaturace dvouřetězcových molekul DNA
Prvotní krok PCR začíná inkubováním při teplotě 94 - 95 °C okolo 5 minut, čímž se dvouřetězcová DNA denaturuje v jednořetězcové DNA.
- Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA
Následně inkubujeme při teplotě 50 - 55 °C, kdy při této teplotě dochází k připojení primerů k cílové sekvenci.
- Syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy
Třetí inkubace probíhá při teplotě 72 °C na 20 - 120 sekund. V PCR směsi dochází díky *Taq*-polymeráze k rozšiřování primerů s následným vznikem dvouřetězcové DNA. Následně se celý proces opakuje, tedy dochází k cyklizaci reakcí [49, 53, 54].

Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocyklér, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním cyklů se

exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku DNA. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů. Čas potřebný k uskutečnění všech cyklů je okolo dvou až tří hodin. Příliš vysoký počet cyklů zvyšuje množství vznikajících nespecifických produktů PCR. Výsledným produktem PCR jsou amplikony, což jsou DNA úseky definované délkou o velikosti obvykle desítek až tisíce párů bazí (bp), analogické restričním fragmentům, jejichž přítomnost se v reakční směsi prokazuje např. stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu [49].

Specifita PCR závisí na návrhu dvou oligonukleotidových primerů. Primery pro standardní PCR musí splňovat následující pravidla:

- délka zpravidla 18-25 nukleotidů,
- obsah G+C 40 % až 60 %,
- rovnoměrná distribuce G/C a A/T páry,
- teplota T_m primeru alespoň 50 °C,
- podobná teplota T_m u obou primerů,
- specifčnost primerů,
- absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbě duplexů,
- absence vnitřních sekundárních struktur (vlásenek),
- zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C v sekvenci na 3'-koncích primerů pro zajištění přesné vazby na templát [49].

Ohromná citlivost PCR je také jejím nedostatkem, protože velký počet amplifikací přispívá k vyšší pravděpodobnosti znečištění. Dokonce i stopa cizí DNA může být amplifikována a tím dávat falešné pozitivní výsledky. Je tedy nutné dodržovat dokonalou čistotu práce a laboratoře [54].

2.4.2.3 PCR-RFLP

PCR-RFLP je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, obsahující sekvenční polymorfismus. RFLP analýza je používána k charakterizaci PCR produktů založená na sekvenčně specifickém štěpení enzymem. Každá restriční endonukleáza štěpí specifickou sekvenci dvouřetězové molekuly DNA, přičemž tato sekvence bývá zpravidla čtyři, pět, šest nebo osm nukleotidů dlouhá. Proces RFLP analýzy kombinuje amplifikaci určitého specifického úseku genomové DNA a následné štěpení PCR produktů různými restričními endonukleázami, kde obvykle následuje elektroforéza na 3 % agarózovém gelu. Elektroforézou lze detekovat polymorfismus uvnitř sekvencí, které se jinak v počtu bází příliš neliší [50, 51, 66].

Restriční endonukleázy jsou enzymy, které poznají specifickou DNA sekvenci nazývanou restriční místo a následně tuto DNA štěpí. Velké množství restričních endonukleáz je izolováno z různých mikrobiálních zdrojů. Restriční enzymová aktivita je obvykle vyjadřována pomocí jednotek, kdy jedna jednotka je množství enzymu, které štěpí všechny specifická místa v 1 µg konkrétního DNA vzorku za jednu hodinu při teplotě 37 °C [61].

S ohromným množstvím komerčně přístupných restričních endonukleáz je výběr vhodného enzymu pro konkrétní RFLP analýzu závislý na cílové sekvenci nukleové kyseliny. V mnoha takových stanoveních mohou být PCR produkty použity přímo po amplifikaci bez dalších úprav vzorku. Pro analýzu RFLP-PCR není potřeba speciálního vybavení. Používáme standardně vodní lázeň nebo inkubátor potřebný pro proces enzymového štěpení. Čas

potřebný pro restrikční enzymové štěpení závisí na štěpící účinnosti enzymu a množství DNA určené ke štěpení. Inkubační čas se velmi často pohybuje v rozmezí od 1 hodiny až po 16 hodin [50].

Koncentrace enzymu, pufr, cílová nukleová kyselina, teplota (obvykle 37 °C) a průběh reakce, který se mění od enzymu k enzymu, jsou hlavními determinantami pro kvalitu štěpící reakce. Čistota nukleové kyseliny je rozhodující pro hladký průběh reakce, tzn. je třeba se vyhnout nečistotám, kterými jsou proteiny, vysoké koncentrace solí, antikoagulanty a rozpouštědla, které mohou pocházet z DNA extrakce nebo z čistícího procesu. Vyjmenované nečistoty jsou hlavními inhibitory restrikčních endonukleáz. Zmíněný negativní efekt nečistot lze zmírnit použitím vyšší koncentrace enzymu, zvýšením reakčního objemu, zvýšením času inkubace nebo přečištěním cílové nukleové kyseliny [50].

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Suroviny

Základní surovinou byl vinný mošt připravený lisováním hroznů révy vinné modré odrůdy Rulandské modré. Z moštu byly izolovány kvasinky, které byly následně identifikovány. Partnerem, který poskytl surovinu pro naši práci, bylo vinařství Holánek sídlící v obci Ivaň v mikulovské vinařské podoblasti. Vinařství hospodaří systémem integrované a ekologické produkce.

3.2 Chemikálie

- 10x *Taq* DNA pufr (*KAPA BIOSYSTEMS, USA*)
- Agar (*HiMedia Laboratories, Indie*)
- Agaróza (*SERVA, Německo*)
- Délkový standard 100 bp (*BioLabs, New England*)
- Délkový standard 20 bp (*TaKaRa Bio, Japonsko*)
- dNTP mix (*Invitek, Německo*)
- Ethanol (*Lach-Ner s.r.o., Neratovice*)
- Ethidium bromid (*SERVA, Německo*)
- Hydroxid sodný (*Lach-Ner s.r.o., Neratovice*)
- Komerční sada UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (*Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR*)
- Kyselina boritá (*Mach-chemikálie s.r.o., Ostrava*)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA (*Sigma-Aldrich, Německo*)
- Kyselina chlorovodíková (*Lach-Ner s.r.o., Neratovice*)
- Kyselina propionová
- Nanášecí pufr Loading Buffer (*Fermentas, Litva*)
- Octan sodný (*Lach-Ner s.r.o., Neratovice*)
- Parafínový olej (*Penta, Praha*)
- Primery (ITS1 a ITS4), (*Invitek, Německo*)
- Restrikční endonukleázy: *Hae*III, *Hinf*I, *Taq*aI (*Fermentas, Litva*)
- Sladina (*pivovar Brno*)
- Sterilní a deionizovaná voda
- Streptomycin sulphate (*HiMedia Laboratories, Indie*)
- *Taq* DNA polymeráza (*KAPA BIOSYSTEMS, USA*)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan C₄H₁₁NO₃ (*SERVA, Německo*)
- Uhličitan sodný (*Lachema, Brno*)

3.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (*A&D, Instruments LTD, Japonsko*)
- Bakteriologická klička
- Büchnerova nálevka
- Buničitá vata
- Centrifuga eppendorf 5417 R (*Eppendorf AG, Německo*)

- Elektroforetické vany (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Exikátor
- Kahan
- Laboratorní sklo
- Lednice a mrazák pro uchování chemikálií a vzorků DNA
- Mikrofiltr
- Mikropipety Biohit (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Mikroskop
- Mikrovlnná trouba ETA 1195
- Mikrozkuhavky Eppendorf
- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (*Biotech s.r.o., ČR*)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (*Implen GmbH, Mnichov, Německo*)
- Parafilm (*American Nacional Can™, USA*)
- Plastové Petriho misky
- Předvážky EK-600 H (*A&D, Instruments LTD, Japonsko*)
- Software BioNumerics (*Applied Maths, USA*)
- Software Scion Image (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci AURA mini (*Bioair instruments, Itálie*)
- Stojany na zkumavky
- Termocyklér PTC-100TM (*MJ Research, Inc, USA*)
- Termostat IP 100-U LTE SCIENTIFIC (*Velká Británie*)
- Transluminátor (*Ultra Lum. INC, USA*)
- Vodní vývěva
- Vortex LABNET VX 100 (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Vortex-Genie 2, MO Bio (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Zdroj napětí - Major Science MP-500P (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Zdroj napětí - SAVANT PS 250 (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Zkumavky

3.4 Příprava pracovních roztoků

3.4.1 Příprava TBE pufru

Byl připraven zásobní roztok 10×TBE pufru, ze kterého byly připraveny dva pracovní roztoky 1×TBE pufr určený pro přípravu gelu a 1×TBE pufr s ethidium bromidem, jakožto pufr vodivosti.

3.4.1.1 Příprava 10×TBE pufru

Nejprve byl připraven 0,5 M roztok EDTA o pH 8. Příprava probíhala kvantitativním převedením 9,36 g EDTA do odměrné baňky (50 ml) a následným doplněním destilovanou vodou na konkrétní objem. K úpravě roztoku EDTA na požadovanou hodnotu bylo nutné přidávat opatrně 0,5 % NaOH.

Posléze bylo naváženo 108 g Tris a 55 g kyseliny borité (H_3BO_3). Následně se tato množství kvantitativně převedla do odměrné baňky (1000 ml). Přidalo se 40 ml 0,5 M EDTA

o pH 8, načež se odměrná baňka doplnila destilovanou vodou po rysku. Takto byl získán zásobní roztok 10×TBE pufru.

3.4.1.2 Příprava 1×TBE pufru

Pro přípravu 1×TBE pufru, který měl využití při tvorbě agarózových gelů, bylo nutné do odměrné baňky (1000 ml) převést 100 ml 10×TBE pufru a destilovanou vodou doplnit na konkrétní objem.

3.4.1.3 Příprava 1×TBE pufru s ethidium bromidem

Pro přípravu 1×TBE pufru s ethidium bromidem, který měl využití jako vodivostní pufr při elektroforetické detekci DNA fragmentů, bylo nutné do odměrné baňky (1000 ml) převést 100 ml 10×TBE pufru a destilovanou vodou doplnit po rysku na požadovaný objem 1000 ml. Následně se k této směsi přidalo 100 µl ethidium bromidu.

3.4.2 Příprava ethidium bromidu

Navážením 10 mg ethidium bromidu a následným rozpuštěním v 1 ml destilované vody se získal roztok o koncentraci 10 mg/ml. Ethidium bromid byl nezbytný pro vizualizaci fragmentů DNA na gelu, nicméně bylo nutné s touto sloučeninou pracovat s velkou opatrností pro svoji prokázanou mutagenitu a potenciální karcinogenitu.

3.4.3 Příprava 2 % agarózového gelu

Pro přípravu 2 % agarózového gelu bylo do Erlenmayerovy baňky přidáno 150 ml 1×TBE pufru. Následně byly přidány 3 g agarózy a celá směs se důkladně rozpustila zahříváním v mikrovlnné troubě, kdy indikátorem dokonalého rozpuštění byl čirý roztok bez krystalků agarózy. Po vizuální kontrole čírého roztoku se posléze do roztoku přidalo fluorescenční barvivo ethidium bromid o objemu 15 µl. Požadovaný objem gelu 150 ml se vztahoval k velikosti elektroforetické vany, potažmo k délce gelu 23 cm.

Po dokonalé homogenizaci roztoku byla celá směs nalita do elektroforetické vany, do které se přidaly hřebínky pro tvorbu jamek, do nichž se po ztuhnutí gelu aplikovaly vzorky.

Připravený kapalný gel se nechal 30-40 min při laboratorní teplotě ztuhnout. Po uplynulém čase se z gelu vytáhly hřebínky. Tímto postupem byl připraven 2 % agarózový gel, který se využíval pro separaci PCR produktů a restričních fragmentů získaných restriční analýzou.

3.4.4 Příprava délkových standardů 20 a 100 bp

Pro přípravu délkového standardu 20 bp bylo nutné smíchat 2,5 µl sterilní vody, 1 µl nanášecího pufru a 2,5 µl roztoku délkového standardu 20 bp. Délkový standard 100 bp byl už předem připraven firmou, pouze se aplikoval na gel v množství 3 µl.

3.4.5 Příprava 3 M octanového pufru

Roztok vzniklý rozpuštěním 2,46 g octanu sodného v destilované vodě a upravený na pH 5,5 pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové jsme převedli do odměrné baňky (10 ml) a doplnili destilovanou vodou po rysku. Tímto způsobem připravený roztok se používal při přechišťování PCR produktů. Roztok byl uchován v lednici při teplotě 4 °C.

3.4.6 Příprava 80 % ethanolu

Odpipetováním 1,6 ml 96 % ethanolu a 0,32 ml destilované vody do mikrozkušavky (2 ml) a jejím důsledným promícháním na vortexu jsme získali 80 % ethanol. Připravený 80 % ethanol i 96 % ethanol, byly ponechány v mrazáku při teplotě -20 °C. Ethanol o koncentraci 80 % a 96 % se používal na přečišťování PCR produktů.

3.5 Příprava kultivačního média

Kvasinky získané z moštu se kultivovaly na sladinovém médiu, které bylo připraveno následovně:

- Erlenmayerova baňka byla naplněna 200 ml sladiny pocházející z pivovaru Starobrno.
- Následně byl roztok upraven destilovanou vodou na cukernatost 7 °ČNM a přidáním uhličitanu sodného bylo upraveno pH na 6,8.
- V dalším kroku se přidal agar (2 %) a vzniklá směs byla sterilizována při 115 °C po dobu 20 minut.
- Směs se nechala schladit na teplotu na teplotu 60 °C. Přidalo se antibiotikum (250 µg/l) zabírající nežádoucímu růstu bakterií a kyselina propionová (0,25 ml/l) proti růstu plísní.
- Připravené kultivační médium bylo rovnoměrně rozlito na Petriho misky a do připravených zkumavek.
- Kvasinky byly naočkovány na plochu agaru v Petriho misce.
- Pro dlouhodobé uchování se vyizolované čisté kultury přeočkovaly na šikmé agary ve zkumavkách a následně přelily parafinovým olejem.

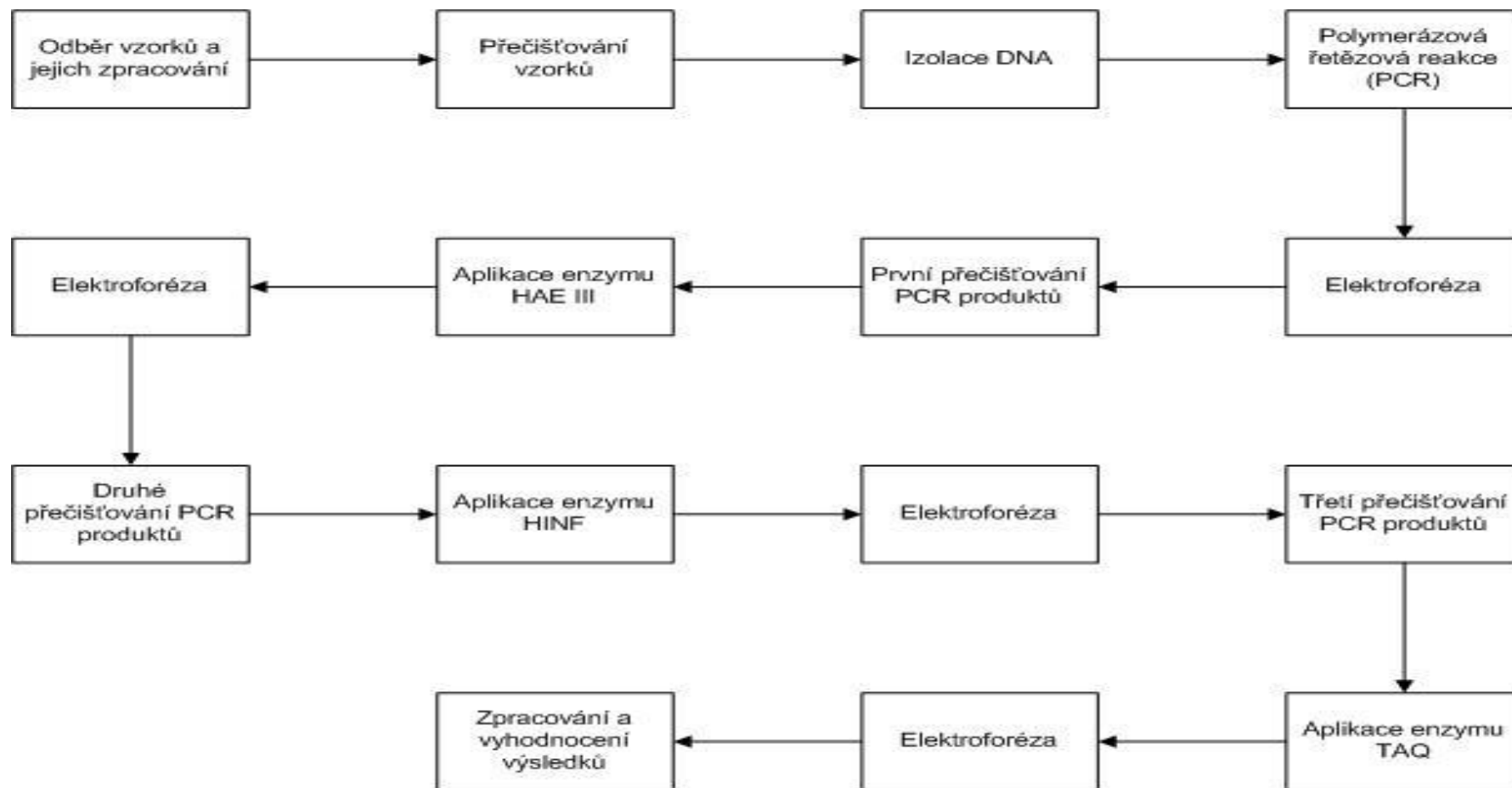
3.5.1 Příprava šikmých agarů

Do čtvrtinového objemu zkumavky bylo nalito sladinové médium, načež se zkumavky zazátkovaly a vysterilizovaly v tlakovém hrnci po dobu 20 minut. Poté se nechala sladina ztuhnout v šikmé poloze při laboratorní teplotě.

3.6 Pracovní postupy

3.6.1 Postupový diagram

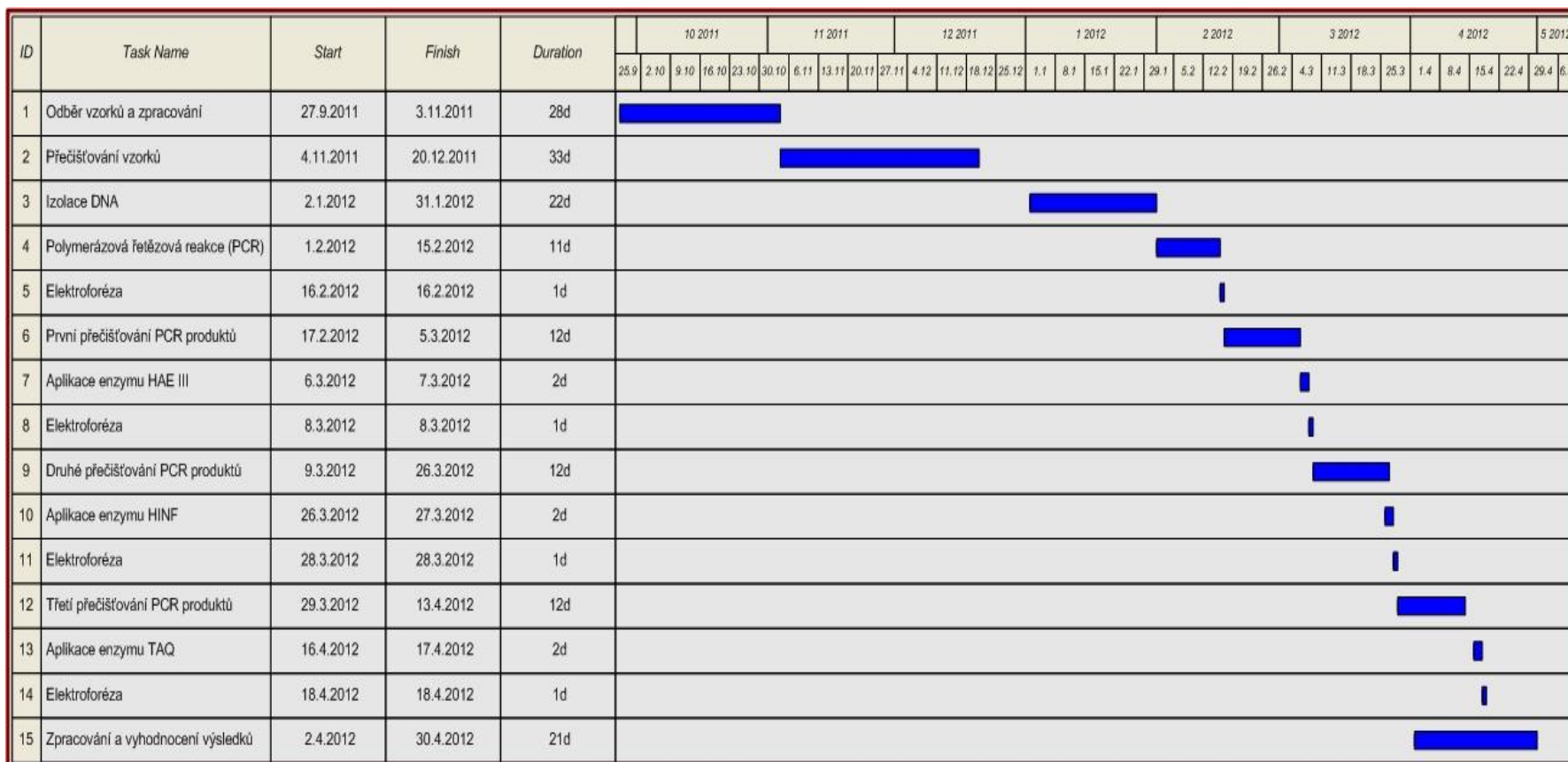
Postupový diagram vyjadřuje logickou posloupnost prováděných činností za účelem identifikace kvasinek. Postupový diagram byl vytvořen v programu Microsoft Office Visio 2007.



Obr. č. 6: Postupový diagram

3.6.2 Ganttův digram

Harmonogram průběhu jednotlivých činností vyjádřený graficky pomocí Ganttova diagramu (obr. 7). Ganttův diagram byl vytvořen v programu Microsoft Office Visio 2007.



Obr. č. 7: Ganttův diagram

3.6.3 Odběr vzorků a jejich zpracování

Odběry vinného moštu probíhaly ve vinném sklepě Ing. Holánka, kde byl vinný mošt skladován při teplotě okolo 15 °C. Tímto uchováním moštu se zajistily stálé klimatické podmínky a stabilní růst kvasinek. První odběry vzorků začaly ihned po vylisování moštu do předem vysterilizovaných zavařovacích sklenic s víčkem. Vzorky byly převáženy v chladicím boxu. Vždy bylo nutné vzorky zpracovat do 48 hodin po odběru ze sklepa. Termíny odběrů jsou názorně uvedeny v tab. č. 3.

Tab. č. 3: Harmonogram odběrů vinného moštu

Vinný mošt - Rulandské modré	
Pořadí odběru	Datum odběru
1.	27. 9. 2011
2.	29. 9. 2011
3.	3. 10. 2011
4.	5. 10. 2011
5.	7. 10. 2011
6.	10. 10. 2011
7.	12. 10. 2011
8.	14. 10. 2011
9.	17. 10. 2011
10.	19. 10. 2011
11.	21. 10. 2011

Zpracování vzorků moštu probíhalo následovně:

- Filtrace moštu byla provedena pod tlakem vodní vývěvy přes bakteriologický filtr v Büchnerově nálevce. Všechny činnosti byly prováděny ve sterilním boxu.
- Ihned po ukončení filtrace bylo nezbytné přenést mikrobiální filtr na Petriho misku se sladidlovým agarem, který obsahoval antibiotikum a kyselinu propionovou pro potlačení růstu nežádoucí mikroflóry.
- Tyto Petriho misky byly kultivovány po dobu 5 až 7 dní v termostatu při teplotě 26 °C.

3.6.4 Izolace čisté kultury kvasinek

K získání čisté kultury kvasinek bylo nutné použít modifikovanou Kochovu zředňovací metodu, která spočívá ve zředění buněk ve sterilní vodě s následným křížovým roztěrem. Kochova zředňovací metoda pomohla získat čisté kultury kvasinek ze směsných kultur kvasinek. Práce probíhala ve sterilním boxu následujícím způsobem:

- Bakteriologickou kličkou byla z Petriho misky odebrána dvě očka kultury a následně převedena do zkumavky s 10 ml sterilní vody.
- V dalším kroku byla suspenze buněk ve zkumavce dokonale promíchána na vortexu a z této zkumavky bylo odebráno 50 µl a následně převedeno do další zkumavky s 10 ml sterilní vody.
- Opět bylo provedeno důkladné promíchání, načež byl odebrán 1 ml z obsahu této zkumavky. Tento byl převeden do poslední zkumavky s 9 ml sterilní vody.

- Po homogenizaci se z této zkumavky odpipetovalo 30 µl z celkového objemu a přeneslo na Petriho misku. Bakteriologickou kličkou byl následně proveden křížový roztěr. Kvasinky byly kultivovány po dobu 2 – 4 dny při teplotě 26 °C.
- Po kultivaci byly jednotlivé kolonie přeočkovány na novou Petriho misku tak, že byly rozetřeny po celé ploše a opět kultivovány v termostatu. Kultivace trvala 2 – 3 dny při teplotě 26 °C.

Postup byl opakován nejméně třikrát a výsledkem byl zisk čistých kultur kvasinek. Aby se zjistila čistota jednotlivých kultur, byly kontrolovány mikroskopicky. Následně byly čisté kultury přeočkovány na šikmé agary ve zkumavce, přelity sterilním parafinovým olejem a uchovávány v chladícím boxu při 7 °C.

3.6.5 Izolace DNA

Izolace kvasinkové DNA byla umožněna použitím komerčního setu UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit.

Postup izolace DNA probíhal následovně:

- Nejdříve byly nachystány rozbíjecí zkumavky, do nichž bylo napipetováno 300 µl rozbíjecího pufru a následně se v nich rozsuspendovaly jedno až dvě očka kvasinkové kultury. Tato část procesu izolace DNA probíhala ve sterilním boxu.
- K této vytvořené směsi bylo přidáno 50 µl roztoku MD1, načež byly mikrozkumavky řádně uzavřeny. Poté se mikrozkumavky uložily v horizontální poloze do adaptéru vortexu. Při maximální rychlosti byly následně tyto mikrozkumavky vortexovány přesně 10 minut.
- Po vortexování následovala centrifugace na centrifuze (viz obr. 8) při 10 000×g po dobu 30 sekund. Vše probíhalo při pokojové teplotě.
- Vzniklý supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkumavky. Poté bylo do této mikrozkumavky přidáno 100 µl roztoku MD2. Směs byla velmi krátce promíchána na vortexu a poté byla inkubována při teplotě 4 °C po dobu 5 min.
- Celou směs bylo nutné zcentrifugovat (1 minuta při 10 000×g) a poté byl supernatant převeden do předem připravené nové mikrozkumavky. K tomuto supernatantu bylo přidáno 900 µl roztoku MD3 a celá směs byla velmi krátce vortexována.
- Z takto vzniklého roztoku bylo odpipetováno 700 µl na kolonku v mikrozkumavce a následně byla provedena opětovná centrifugace (1 minuta při 10 000×g). Odstraněním přefiltrovaného roztoku byl na stejnou kolonku přepipetován zbytek roztoku.
- Byla provedena centrifugace (1 minuta při 10 000×g) a vzniklý přefiltrovaný roztok byl opět odstraněn. Poté bylo do kolonky přidáno 300 µl roztoku MD4.
- Po centrifugaci (1 minuta při 10 000×g) byla kolonka přenesena do připravené mikrozkumavky a do středu bílé membrány této mikrozkumavky bylo napipetováno 50 µl roztoku MD5.
- Následně bylo provedeno poslední centrifugování (1 minuta při 10 000×g) mikrozkumavek, načež se kolonka odstranila. DNA, která byla v mikrozkumavce, byla připravena pro další použití.
- DNA musela být skladována při -20 °C.

Pro zjištění účinnosti izolace byla změřena koncentrace DNA u vytipovaných vzorků na spektrofotometru.



Obr. 8: Centrifuga

3.6.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Použitím polymerázové řetězové reakce (PCR) byla provedena amplifikace oblasti 5,8S-ITS rDNA za pomoci primerů ITS1 a ITS4. Sekvence primerů ITS1 a ITS4 je v tab. č. 4.

Tab. č. 4: Sekvence primerů ITS1 a ITS4

Primer	Sekvence
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

3.6.6.1 Příprava PCR směsi

Pro přípravu PCR směsi byl využit sterilní box, ve kterém byly komponenty reakční směsi pipetovány do mikrozkušavky v přesně daném pořadí o určitém objemu. Konkrétní pořadí a množství komponent jsou zaznamenány v tabulce č. 5. Celkový objem směsi činil 150 μ l. V případě většího množství vzorků bylo výhodné vytvořit zásobní roztok tvořený všemi komponentami mimo templátové DNA a *Taq* DNA polymerázy. Ty se přidaly až po rozdělení zásobního roztoku do jednotlivých mikrozkušavek.

Tab. č. 5: Komponenty PCR směsi pro jeden vzorek

Komponenty	Množství (μl)
Sterilní voda	125,4
Pufr	15
dNTP mix	3
Primer ITS1	1,5
Primer ITS4	1,5
Templátová DNA	3
Taq DNA polymeráza	0,6

3.6.6.2 Průběh PCR reakce

Připravené mikrozkušavky s PCR směsí, DNA a Taq polymerázou byly zvortexovány a umístěny do termocykléru. Polymerázová řetězová reakce probíhala ve třech krocích, které se opakovaly ve 25 cyklech. Každý krok měl specifickou teplotu, která určovala děj, který se v PCR směsi odehrával. Jednotlivé kroky, časové požadavky a konkrétní teploty jsou vyznačeny v tab. č. 6:

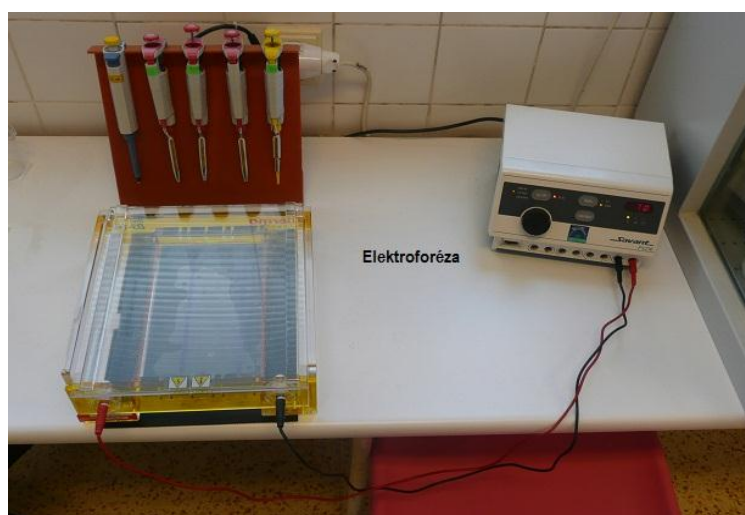
Tab. č. 6: Program pro PCR

Kroky PCR reakce		Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace DNA		94	4
Denaturace DNA	25x	94	1
Připojení primerů		48	0,5
Syntéza nového vlákna		72	1
Syntéza nového vlákna		72	10

3.6.7 Elektroforetická detekce PCR produktů

Pro detekci PCR produktů byla využita elektroforéza (obr. 9). Správný postup pro přípravu aparatury a pro aplikaci vzorku bylo nutné postupovat tímto způsobem:

- Připravený 2 % agarózový gel byl nalit do připravené a vyvážené vany.
- Vložením hřebíků do tekutého gelu byl gel ponechán ke ztuhnutí.
- Po ztuhnutí a vytažení hřebíků byla elektroforetická vana naplněna roztokem 1×TBE s ethidium bromidem.
- Pro správnou aplikaci vzorků bylo nutné nanést na předem připravený parafilm 1 μl nanášecího pufru a ten smíchat s 2 μl naamplifikovaných(é) DNA. Poté se tato směs aplikovala do jednotlivých jamek v množství 2 μl.
- Délkový standard byl aplikován do krajních jamek gelu v množství 3 μl a uprostřed gelu v množství 2 μl.
- Následně byla elektroforetická vana připojena ke zdroji napětí (70 V).
- Čas potřebný pro elektroforetickou separaci produktů PCR byl 2,5 hodiny.
- K vizualizaci PCR produktů na gelu bylo využito transluminátoru, který vyzařoval UV záření. Záznam gelu byl pořízen pomocí programu Scion Image.



Obr. 9: Elektroforéza PCR produktů

3.6.8 Přečištění PCR produktů

Pro restrikční analýzu bylo nutné PCR produkt přečistit následujícím způsobem:

- Byla vytvořena směs pipetováním konkrétních komponent do mikrozkušavky. Jednotlivé komponenty byly 20 μ l PCR produktu, 2 μ l octanového pufru a 60 μ l 96 % ethanolu.
- Tuto směs bylo nutné promíchat na vortexu a následně centrifugovat při teplotě 4 °C a 15 000 otáčkách po dobu 30 minut.
- Po provedené dekantaci supernatantu bylo nutné přidat do mikrozkušavky 60 μ l 80 % ethanolu.
- Centrifugací při konzistentních podmínkách vznikl supernatant, který byl dekantován a vzniklý sediment byl vysušen v exikátoru. Bylo nutné odstranit všechny ethanol.
- Přečištěný PCR produkt byl skladován při teplotě -20 °C v mrazáku.

3.6.9 Restrikční analýza

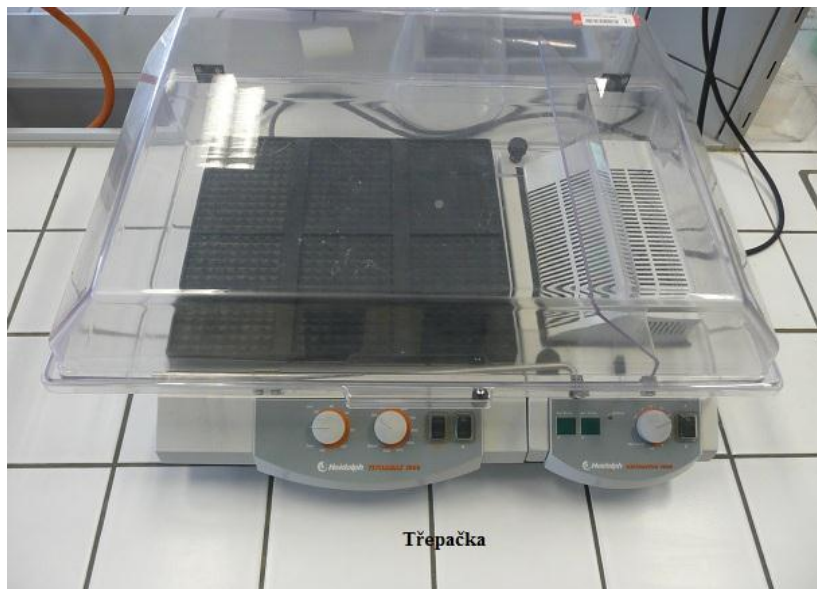
V rámci restrikční analýzy byly aplikovány postupně tři restrikční endonukleázy: *HaeIII*, *HinfI* a *TaqI* k přečištěnému PCR produktu společně s dalšími komponentami v pořadí daném v tabulce č. 7.

Tab. č. 7: Komponenty pro restrikční analýzu a jejich množství

Komponenty	Množství (μ l)
Sterilní voda	13
Pufr	1,5
Konkrétní enzym	0,5

Restrikční analýza byla prováděna s větším množstvím vzorků, což znamenalo, že byla nejdříve z výše uvedených komponent připravena reakční směs o větším objemu a důkladně zhomogenizována na vortexu. Posléze bylo vždy odpipetováno 15 μ l z této

směsi a přidáno k přečištěným PCR produktům. Všechny činnosti musely probíhat ve sterilním boxu. Poté byla směs s přečištěnými PCR produkty inkubována při teplotě 37 °C v třepačce (viz obr. 10). Inaktivace všech 3 restriktáz byla provedena zvýšením teploty na 80 °C. Následně mohly být vzorky podrobeny elektroforetické analýze nebo uchovány při teplotě -20 °C v mrazáku k pozdější analýze.



Obr. 10: Třepačka

3.6.10 Elektroforéza restrikčních fragmentů

Získané produkty restrikční analýzy byly detekovány elektroforeticky na připraveném 2 % gelu. Aby se vzorky udržely v jamkách gelu, byly před aplikací smíchány s nanášecím pufrem. Pro kontrolu enzymaticky provedeného štěpení se zařazuje tzv. pozitivní kontrola, což je PCR produkt. Jako poslední byly na gel naneseny délkové standardy o délce 100 bp a 20 bp v množství 3 μ l.

Elektroforetická separace restrikčních fragmentů probíhala po dobu 2 hod a 20 minut při konstantní napěti 70 V. Vizualizace fragmentů DNA byla provedena pomocí UV záření v transluminátoru, přičemž se obraz gelu se opět zaznamenal pomocí programu Scion Image.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Odběr vzorků a jejich zpracování pro izolaci DNA

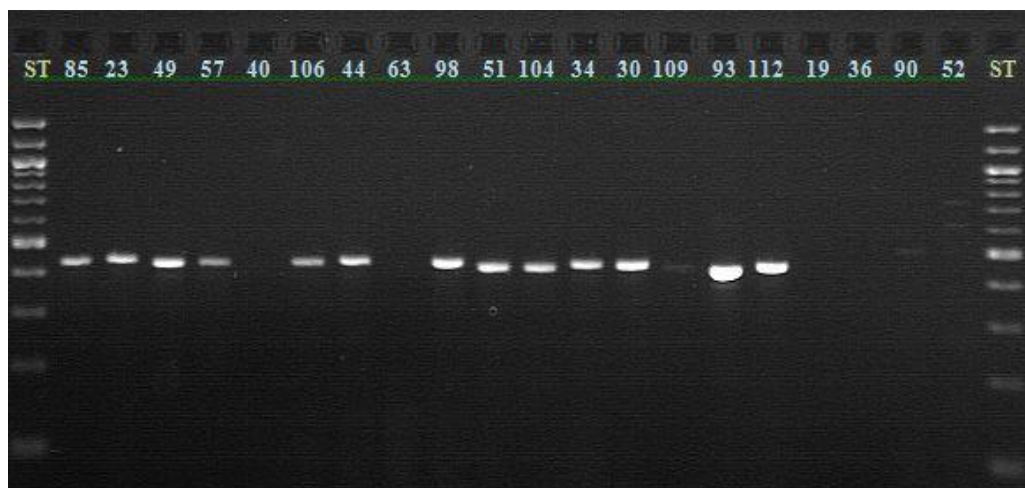
Každý vzorek, který byl odebrán z různé fáze kvašení, dostal své identifikační číslo. Identifikační čísla vzorků určovala konkrétní pořadí odběru a původ odběru. Odběry byly provedeny z vinného moštu ekologické produkce, z vinného moštu integrované produkce a z bobulí vypěstované ekologickou, integrovanou a konvenční produkcí. V tabulce č. 1 v příloze 1 jsou uvedeny všechny odběry. V tabulce jsou tyto zkratky:

- REM* – Rulandské modré, ekologická produkce, mošt
- RIM – Rulandské modré, integrovaná produkce, mošt
- REB – Rulandské modré, ekologická produkce, bobule
- RIB – Rulandské modré, integrovaná produkce, bobule
- RKB – Rulandské modré, konvenční produkce, bobule

Následně byly izolovány čisté kultury kvasinek postupem uvedeným v kapitole 3.6.4. Z těchto čistých kultur byla vyizolována DNA postupem uvedeným v kapitole 3.6.5.

4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla provedena podle postupu v kapitole 3.6.6. Následná elektroforéza PCR produktů byla provedena podle postupu v kapitole 3.6.7. Elektroforeogramy PCR produktů jsou zobrazeny na obr. 11 a v příloze 2.



Obr. 11: Ukázka elektroforeogramu PCR produktů získaný amplifikací primery ITS1 a ITS4, (ST – délkový standard 100 bp)

Na základě PCR byly analyzované kvasinky rozděleny do skupin podle délky PCR fragmentu, což je zaznamenáno v tabulce č. 8 pro ekologickou produkci a v tabulce č. 9 pro integrovanou produkci.

* Číslo u zkratky značí pořadí odběru.

Tab. č. 8: Velikosti PCR produktů jednotlivých vzorků ekologické produkce.

Velikost PCR produktu (bp)	Identifikační číslo vzorku
430	48, 45, 25
450	28, 22, 32, 30, 39, 26, 44, 23, 41, 19, 33, 24, 20, 47, 35, 18, 51, 50, 27, 58, 31, 42, 43, 57, 37, 38, 49, 36, 21, 46
480	53, 54
500	11
750	7, 55
880	16, 17, 29, 2, 1, 4, 8, 3, 14, 10

Tab. č. 9: Velikost PCR produktů jednotlivých vzorků integrované produkce.

Velikost PCR produktu (bp)	Identifikační číslo vzorku
430	85, 100, 83, 84,
450	117, 88, 106, 96, 86, 115, 93, 102, 62, 97, 107, 113, 108, 116, 109, 105, 82, 110, 124, 112, 91, 99, 89, 95, 104, 114, 125, 92, 98, 101
480	111, 121, 119, 122, 120, 81, 82
500	90, 94, 123, 103
880	72, 63, 59, 65, 79, 80, 61, 66, 75, 64, 15, 77, 71, 68, 67, 60

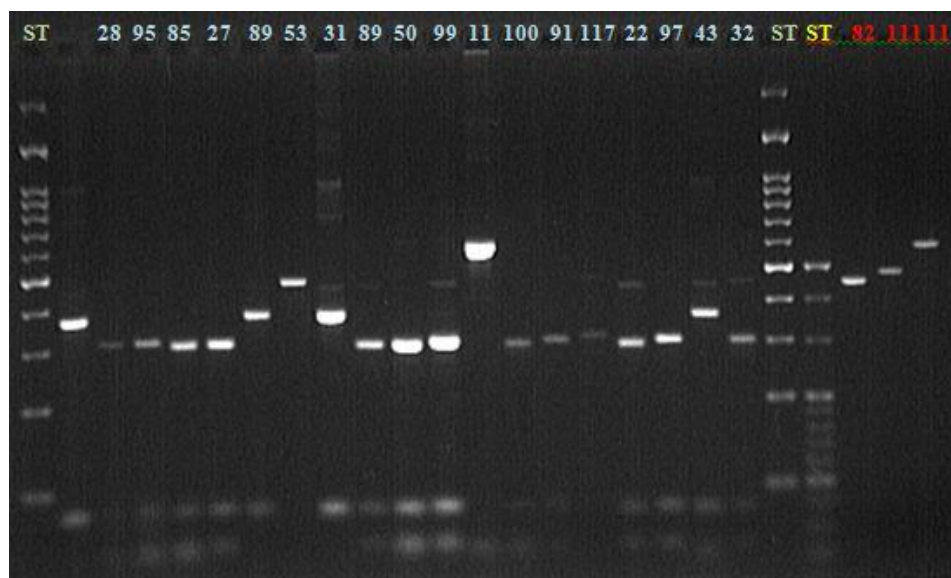
4.3 Restrikční analýza produktů PCR

PCR produkty bylo nutné před aplikací enzymů přechistit, protože čistota nukleové kyseliny byla rozhodující pro hladký průběh reakce. Přechištění bylo provedeno ethanolom a octanem sodným (viz kapitola 3.6.8), kdy byly odstraněny ostatní složky PCR směsi, které mohly působit jako inhibitory restrikčních endonukleáz.

Restrikční endonukleázy byly aplikovány k čisté DNA v pořadí *HaeIII*, *HinfI* a *TaqI*. Po inkubaci vzorků s konkrétními enzymy následovala elektroforetická detekce s následným porovnáním délek restrikčních fragmentů izolovaných kvasinek s délkami fragmentů typových kvasinek. Restrikční analýza typových kvasinek nebyla vzhledem k množství analyzovaných vzorků prováděna, ale bylo využito databáze, která byla vytvořena v předchozích pracích [68, 69, 70, 71].

4.3.1 Restrikční analýza pomocí restrikční endonukleázy *HaeIII*

Restrikční endonukleáza *HaeIII* byla prvním aplikovaným enzymem. Enzym štěpí DNA v místě výskytu sekvence GGCC. Ke štěpení dochází mezi nukleotidy G a C. Vzniklé fragmenty označované jako restrikční fragmenty byly detekovány elektroforeticky. Vybraný příklad elektroforeogramu restrikčních fragmentů vzniklý štěpením enzymem *HaeIII* je zobrazen na obr. 12 a ostatní v příloze 3.



Obr. 12: Ukázka elektroforeogramu restričních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restriční endonukleázy *HaeIII*, (ST – dělkový standard 100 bp, **ST** – dělkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 82, 111, 11).

Tabulka č. 10 sumarizuje délky fragmentů vzniklé restriční analýzou PCR produktů, které byly získány ze vzorků moštů z ekologické produkce. Restriční analýzou PCR produktů s délkou 450 bp a 430 bp byly získány dvě skupiny s délkami fragmentů 300+80+50 bp a 380+80 bp. PCR produkt o délce 480 bp nebyl touto restriktázou štěpen, stejně tak i vzorek s velikostí PCR produktu 500 bp. Vzorky č. 7 a 55 s velikostí PCR produktu 750 bp poskytovaly po štěpení fragmenty o délce 480+130+100 bp. PCR produkty o délce 880 bp byly rozštěpeny na fragmenty o délce 310+240+180+130 bp.

Tab. 10 : Výsledky restriční analýzy PCR produktů enzymem *HaeIII* pro ekologickou produkci.

Identifikační číslo vzorku	Velikost PCR produktu (bp)	Délka restričních fragmentů (bp)
48, 45, 25	430	300+80+50
28, 22, 32, 30, 39, 26, 44, 23, 41, 19, 33, 24, 20, 47, 35, 18, 51, 50, 27, 58	450	300+80+50
31, 42, 43, 57, 37, 38, 49, 36, 21, 46	450	380+80
53, 54	480	Neštěpeno
11	500	Neštěpeno
7	750	480+130+100
55	750	Neštěpeno
16, 17, 29, 2, 1, 4, 8, 3, 14, 10	880	310+240+180+130

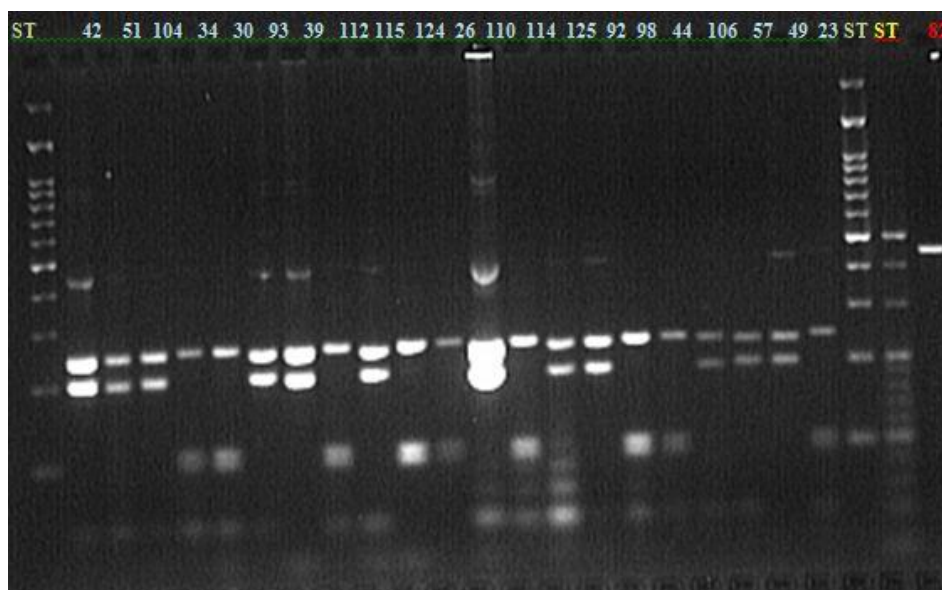
V tabulce č. 11 jsou zaznamenány délky fragmentů vzniklé restrikční analýzou PCR produktů, které byly získány ze vzorků moštu z integrované produkce. Restrikční analýzou PCR produktů s délkou 450 bp a 430 bp byly získány fragmenty s délkou 300+80+50 bp. Kromě toho, PCR produkty s délkou 450 bp poskytly také restrikční analýzou fragmenty o délce 380+80 bp, 300+110 bp nebo 320+80+50 bp. PCR produkty o délce 480 bp byly rozštěpeny na fragmenty o délce 320+80+50 bp a v jednom případě nebyl vzorek štěpen vůbec (nemá pro danou restriktázu štěpné místo). Vzorky s velikostí PCR produktu 500 bp byly štěpeny na fragmenty o délce 380+80 bp a vzorky s velikostí PCR produktu 880 bp byly rozštěpeny na fragmenty o délce 310+240+180+130 bp.

Tab. 11: Výsledky restrikční analýzy PCR produktů enzymem HaeIII pro integrovanou produkci.

Identifikační číslo vzorku	Velikost PCR produktu (bp)	Délka restrikčních fragmentů (bp)
85, 100, 83, 84	430	300+80+50
95, 89, 99, 91, 112, 124, 110, 82, 105, 109, 116, 108, 113, 107, 97, 62, 102, 104, 114, 125, 92, 98	450	300+80+50
93, 115, 86, 96	450	380+80
106, 88	450	300+110
117	450	320+80+50
101	500	380+80
111, 121, 119, 122, 120	480	320+80+50
81	480	Neštěpeno
82	480	250+100+90
90, 94, 123, 103	500	380+80
72, 63, 59, 65, 79, 80, 61, 66, 75, 64, 15, 77, 71, 68, 67, 60	880	310+240+180+130

4.3.2 Restrikční analýza pomocí restrikční endonukleázy *HinfI*

Dalším aplikovaným enzymem byla restrikční endonukleáza *HinfI*, který štěpí DNA v místě výskytu sekvence GATC. Ke štěpící reakci dochází mezi nukleotidy G a A. Restrikční fragmenty byly opět detekovány elektroforeticky. Ukázka restrikčních fragmentů je na obr. 13 a ostatní v příloze 3.



Obr. 13: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *HinfI*, (ST – délkový standard 100 bp, **ST** – délkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 82).

V tabulce č. 12 jsou uvedeny délky fragmentů vzniklé restrikční analýzou PCR produktů, které byly získány ze vzorků moštu z ekologické produkce. Restrikční analýzou PCR produktů s délkou 430 bp a 450 bp byly získány fragmenty s délkou 250+200 a 250+110+100 bp. PCR produkty s délkou 480 bp poskytly restrikční analýzou fragmenty o délce 230+230 bp. Vzorek č. 11 s velikostí PCR produktu 600 bp byl rozštěpen na fragmenty délky 300+300 bp. PCR produkty o délce 750 bp byly rozštěpeny na fragmenty o délce 380 bp a 350+190+160 bp.

Tab. 12: Výsledky restrikční analýzy PCR produktů enzymem *HinfI* pro ekologickou produkci

Identifikační číslo vzorku	Velikost PCR produktu (bp)	Délka restrikčních fragmentů (bp)
45, 48, 25	430	250+200
28, 22, 39, 45, 33, 20, 47, 35, 51, 50, 27, 58, 31, 42, 43, 57, 49, 36, 21, 24, 20, 37, 38, 46	450	250+200
32, 30, 26, 44, 23, 41, 19, 18	450	250+110+100
53, 54	480	230+230
11	600	300+300
7	750	380
55	750	350+190+160

V tabulce č. 13 jsou zaznamenané délky fragmentů vzniklé restrikční analýzou PCR produktů, které byly získány ze vzorků moštů z integrované produkce. Restrikční analýzou PCR produktů s délkou 450 bp byly získány fragmenty s délkou 250+200 bp, 250+100+100 bp a 210+150+100 bp. PCR produkty s délkou 480 bp poskytly restrikční analýzou fragmenty o délce 280+200 bp. Další vzorky s PCR produktem délky 500 bp byly rozštěpeny na fragmenty o délce 210+150+140 bp. Vzorek č. 81 nebyl touto restriktázou štěpen.

Tab. 13 : Výsledky restrikční analýzy PCR produktů enzymem HinfI pro integrovanou produkci

Identifikační číslo vzorku	Velikost PCR produktu (bp)	Délka restrikčních fragmentů (bp)
95, 99, 91, 112, 124, 82, 105, 108, 113, 97, 62, 102. 84, 98, 114, 82	450	250+100+100
89, 110, 109, 116, 93, 115, 86, 96, 106, 88, 85, 100, 83, 104, 125, 92, 107, 101	450	250+200
117	450	200+150+100
111, 121, 119, 122, 120	480	280+200
81	480	Neštěpeno
90, 94, 123, 103	500	210+150+140

4.3.3 Restrikční analýza pomocí restrikční endonukleázy *TaqI*

Posledním použitým enzymem byla restrikční endonukleáza *TaqI*. Enzym specificky rozpoznává sekvenci TCGA a provádí štěpení mezi nukleotidy T a C. Po elektroforetické detekci byly vyhodnoceny získané elektroforeogramy. Ukázka elektroforeogramu s restrikčními fragmenty je na obr. 14 a ostatní v příloze 3.



Obr. 14: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *TaqI*, (*ST* – délkový standard 100, *ST* – délkový standard 20, pozitivní kontrola – 82, 111, 11, 90).

Tabulka č. 14 ukazuje délky fragmentů vzniklé restrikční analýzou PCR produktů, které byly získány ze vzorků moštu z ekologické produkce. Restrikční analýzou PCR produktů s délkou 450 bp byly získány fragmenty s délkou 190+160+60 bp, 160+120+60 bp a 300+80+50 bp. PCR produkty s délkou 480 bp poskytly restrikční analýzou fragmenty o délce 300+100+60 bp a 260+100 bp. Vzorek č. 11 s PCR produktem délky 580 bp byl rozštěpen na fragmenty 250+200+120+60 bp. Zbývající vzorky č. 7 a 55 s PCR produkty o délce 750 bp byly rozštěpeny na fragmenty o délce 420+320 bp a 350+200+160 bp.

Tab. 14 : Výsledky restrikční analýzy PCR produktů enzymem *TaqI* pro ekologickou produkci

Identifikační číslo vzorku	Velikost PCR produktu (bp)	Délka restrikčních fragmentů (bp)
28, 22, 32, 30, 39, 26, 44, 23, 41, 19	450	190+160+60
31, 42, 43, 57, 37, 38, 49, 36, 21, 46	450	160+120+60
48, 45, 33, 24, 25, 20, 47, 35, 18, 51, 50, 27, 58	450	300+80+50
53	480	300+100+60
54	480	260+100
11	580	250+200+120+60
7	750	420+320
55	750	350+200+160

V tabulce č. 15 jsou zaznamenány délky fragmentů vzniklé restrikční analýzou PCR produktů, které byly získány ze vzorků moštu z integrované produkce. Restrikční analýzou PCR produktů s délkou 430 bp byl získán fragment délky 190+160+60 bp.

U vzorků s amplikony délky 450 bp byly získán fragment s délkou 160+120+60 bp. PCR produkty s délkou 480 bp poskytly restrikční analýzou fragmenty o délce 220+150+60 bp a 300+100+80 bp. Vzorek č. 111 s PCR produktem neměl pro danou restriktázu štěpné místo. Jediný vzorek s velikostí PCR produktu 500 bp byl rozštěpen na fragment délky 220+100+60 bp.

Tab. 15: Výsledky restrikční analýzy PCR produktů enzymem *TaqI* pro integrovanou produkci

Identifikační číslo vzorku	Velikost PCR produktu (bp)	Délka restrikčních fragmentů (bp)
95, 85, 89, 99, 100, 91, 104, 112, 124, 11, 114, 125, 92, 98, 82, 105, 109, 116, 108, 83, 113, 107, 97, 84, 62, 102, 106, 88	430	190+160+60
86, 96, 93, 115, 101	450	160+120+60
111	480	Neštěpeno
121, 119, 122, 120	480	220+150+60
81	480	300+100+80
90, 94, 123, 103	500	220+100+60

4.4 Taxonomické zařazení kvasinek

Vzorky byly identifikovány na základě porovnání délek restrikčních fragmentů pro jednotlivé enzymy (viz kapitola 4.3) s délkami fragmentů typových kvasinek. Délky fragmentů typových kvasinek byly získány z dřívějších diplomových prací [65, 68, 69, 70, 71], ze kterých taxonomické zařazení kvasinek ve vzorcích pro rok 2011/2012 vycházelo. Zároveň bylo provedeno srovnání typů produkce, tj. ekologické a integrované.

- **Ekologická produkce**

- Vzorky o délce PCR produktu 450 bp byly taxonomicky zařazeny jako rod *Pichia*. Restrikční analýzou bylo potvrzeno, že v rámci této skupiny byly rozdíly na úrovni druhu. Byly vytvořeny 4 skupiny podle výsledků restrikční analýzy. První skupinu tvořily vzorky s pracovním označením 36, 28, 42, 57, 49, 21, 31, 43, 46, které se podařilo identifikovat na druhové úrovni jako *Pichia kluyveri*. Další dvě skupiny se také podařilo identifikovat a zařadit na druhové úrovni. U první skupiny vzorků (č. 27, 22, 45, 50) se jednalo o kvasinky druhu *Pichia fermentans*, zatímco u druhé skupiny vzorků (č. 51, 39, 109, 47, 35, 58) se jednalo o kvasinky druhu *Pichia membranifaciens*. Poslední skupinu tvořily vzorky s čísly 30, 26, 44, 23, 41, 19, 18, 32, 33, 34, které bylo možné určit jen na úrovni rodu, tj. *Pichia sp.*
Všechny vzorky s PCR produktem délky 450 bp a vytvořenými skupinami jsou zaznamenány v dendrogramu v příloze 6.
- Vzorky č. 54 a 53 (denodrogram příloha 6) s PCR produktem délky 480 bp byly zařazeny jako *Candida stellata*.
- Vzorek č. 11 s PCR produktem délky 580 bp se nepodařilo taxonomicky zařadit.

- d) Dva vzorky č. 55 a 7 s délkou PCR produktu 750 bp byly taxonomicky určeny na rodové úrovni jako *Hanseniaspora*. Porovnáním výsledků reálných vzorků a vzorků typových kvasinek bylo zjištěno, že se jedná o kvasinky druhu *Hanseniaspora uvarum* (č. 55) a *Hanseniaspora vincae* (č. 7).
- e) Skupinu vzorků č. 2, 16, 17, 29, 3, 14, 10 s velikostí PCR produktu 880 bp byla po restrikční analýze enzymem *HaeIII* zařazena jako rod *Saccharomyces*.

- **Integrovaná produkce**

- a) Největší skupinu vzorků z integrované produkce tvořily vzorky o velikosti amplikonu 450 bp. Tyto vzorky byly rodově zařazeny jako *Pichia*. Restrikční analýzou byla tato skupina rozdělena na 4 skupiny, což dokazuje, že jsou zde druhové rozdíly. První skupinu tvořily vzorky č. 121, 119, 122, 120, které byly určeny jako *Pichia sp.* Vzorky 104, 110, 125, 92, 106, 109, 116, 83, 88 tvořily druhou skupinu zařazenou druhově jako *Pichia fermentans*. Další dvě skupiny vzorků (č. 112, 124, 114, 98, 82, 105, 108, 113, 62, 102, 99, 95) a (č. 89, 78) byly zařazeny jako *Pichia sp.*
- b) Vzorek s číslem 81 byl zařazen jako *Candida sp.*
- c) Vzorky o velikosti PCR produktu 750 bp byly zařazeny rodově jako *Hanseniaspora*. Restrikční analýzou byly vytvořeny dvě skupiny (č. 93, 115, 86, 96) a (č. 101, 89). První skupina byla taxonomicky zařazena jako *Hanseniaspora uvarum* a druhá skupina jako *Hanseniaspora sp.*
- d) PCR produkty o velikosti 880 bp měly vzorky 72, 63, 59, 65, 79, 80, 61, 75, 64, 77, 15, 71, 68, 60, 67, které byly zařazeny jako rod *Saccharomyces*.

Shrnutí identifikovaných a taxonomicky zařazených kvasinek izolovaných v průběhu fází kvašení poskytují tabulky 16 a 17 pro konkrétní typy produkce, tj. ekologické a integrované.

Tab. 16: Pořadí odběru moštu odrůdy Rulandské modré z ekologické produkce a výsledné identifikované kvasinky.

Pořadí odběru vzorků REM	Den kvašení	Číslo vzorku	Taxonomické zařazení
1	1. den	41	<i>Pichia sp.</i>
2	3. den	11	<i>Nezařazeno</i>
		55	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
		53, 54	<i>Candida stellata</i>
		18, 19, 44	<i>Pichia sp.</i>
3	7. den	30, 32, 33	<i>Pichia sp.</i>
4	9. den	21	<i>Pichia kluyveri</i>
		22, 50	<i>Pichia fermentans</i>
		58	<i>Pichia membranifaciens</i>
		23, 26	<i>Pichia sp.</i>
5	11. den	42	<i>Pichia kluyveri</i>
		14	<i>Saccharomyces sp.</i>
6	14. den	45	<i>Pichia fermentans</i>
		34	<i>Pichia sp.</i>
		2, 17	<i>Saccharomyces sp.</i>
7	16. den	31	<i>Pichia kluyveri</i>
		10	<i>Saccharomyces sp.</i>
8	18. den	35, 51, 109	<i>Pichia membranifaciens</i>
		7	<i>Hanseniaspora vineae</i>
10	23. den	28, 36	<i>Pichia kluyveri</i>
		27	<i>Pichia fermentans</i>
		3, 16	<i>Saccharomyces sp.</i>
11	25. den	46, 49	<i>Pichia kluyveri</i>
		39, 47	<i>Pichia membranifaciens</i>
REB		43, 57	<i>Pichia kluyveri</i>
		29	<i>Saccharomyces sp.</i>

Tab. 17: Pořadí odběru moštu odrůdy Rulandské modré z integrované produkce
a identifikovaná kvasinka

Pořadí odběru vzorků RIM	Den kvašení	Číslo vzorku	Taxonomické zařazení	Pořadí odběru vzorků RIM	Den kvašení	Číslo vzorku	Taxonomické zařazení		
1	1. den	115, 96	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	6	14. den	88	<i>Pichia fermentans</i>		
			91, 97, 98, 121, 122			<i>Pichia sp.</i>	89, 124	<i>Pichia sp.</i>	
		92				<i>Pichia fermentans</i>	90	<i>nezařazeno</i>	
							89	<i>Hanseniaspora sp.</i>	
							61	<i>Saccharomyces sp.</i>	
			101				<i>Hanseniaspora sp.</i>		
2	3. den	93	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	7	16. den	78, 105, 108, 120	<i>Pichia sp.</i>		
			81			<i>Candina sp.</i>	104, 106	<i>Pichia fermentans</i>	
			82, 95			<i>Pichia sp.</i>		79, 77	<i>Saccharomyces sp.</i>
			94, 123			<i>nezařazeno</i>		103	<i>nezařazeno</i>
		59	<i>Saccharomyces sp.</i>			62, 102, 119		<i>Pichia sp.</i>	
		100	<i>nezařazeno</i>				8	18. den	109, 110
99	<i>Pichia sp.</i>								
71	<i>Saccharomyces sp.</i>								
83, 125	<i>Pichia fermentans</i>		72, 60	<i>Saccharomyces sp.</i>	111	<i>nezařazeno</i>			
	5	11. den		86	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	9	21. den	112, 113	<i>Pichia sp.</i>
116			<i>Pichia fermentans</i>	63, 80	<i>Saccharomyces sp.</i>				
75			<i>Saccharomyces sp.</i>						

Pořadí odběru vzorků RIM	Den kvašení	Číslo vzorku	Taxonomické zařazení	Pořadí odběru vzorků RIM	Den kvašení	Číslo vzorku	Taxonomické zařazení
10	23. den	114	<i>Pichia sp.</i>	RIB		15	<i>Saccharomyces sp.</i>
		117	<i>nezařazeno</i>				
		68	<i>Saccharomyces sp.</i>				
11	25. den	65, 64, 67	<i>Saccharomyces sp.</i>				

4.5 Dendrogramy identifikovaných kvasinek

Dendrogram kvasinek byl sestaven pomocí programu BioNumerics. Dendrogram byl vytvořen na základě podobnosti genetických znaků kvasinek klastrovou analýzou. Tato analýza umožnila seskupit podobné znaky do jednotlivých shluků. Kontrola správnosti sestavení dendrogramu byla provedena posouzením homogenosti (stejně nebo podobné znaky uvnitř shluku) a heterogenosti (navzájem odlišné shluky) jednotlivých shluků. Vstupní data byla tvořena výsledky restrikční analýzy, která byla provedena pomocí restrikčních endonukleáz *HaeIII*, *HinfI* a *TaqI*.

Čím jsou si vzorky podobnější, tím jsou blíže u sebe v dendrogramu a propojení odpovídá jednotlivým vztahům. Dendrogramy izolovaných kvasinek z ekologické a integrované produkce jsou v příloze 6 a 7. Pro kritérium podobnosti byly zvoleny Jaccardovy koeficienty podobnosti.

Porovnáním délek restrikčních fragmentů izolovaných kvasinek a typových kvasinek z databáze předchozích prací [65, 68, 69, 70, 71] a podle B. Esteve-Zarzoso a spol. [72] bylo možné kvasinky zařadit na úrovni rodu a částečně i druhu. V případě ekologické vinice byla jedna kvasinka, kterou nebylo možné zařadit vzhledem k tomu, že k ní nemáme příslušnou typovou kvasinku.

V rámci dendrogramu byly kvasinky rozděleny na základě genetické podobnosti do 9 skupin. Na úrovni rodu byla zařazena skupina kvasinek rodu *Saccharomyces* (č. 9), *Pichia* (č. 3, 5, 6, 7), *Candida* (č. 4) a *Hanseniaspora* (č. 2, 8). Na úrovni druhu byly zařazeny vzorky č. 36, 28, 42, 57, 49, 21, 31, 43, 46 jako *Pichia kluyveri*, vzorky č. 54, 53 jako *Candida stellata*, vzorky č. 27, 22, 45, 50 *Pichia fermentans*, vzorky č. 51, 39, 109, 47, 35, 58 jako *Pichia membranifaciens* a vzorek č. 7 jako *Hanseniaspora vinai*.

Během kvašení vinného moštu z integrované vinice byly izolovány kvasinky, které byly rozděleny na základě genetické podobnosti do 13 skupin. V tomto případě nebylo možné zařadit 7 kvasinek, jejichž obrazy se po restrikčních analýzách neshodovaly s žádnými typovými kvasinkami. Dále byla určena na úrovni rodu skupina kvasinek rodu *Saccharomyces* (č. 13), *Pichia* (č. 4, 5, 7, 8, 9), *Candida* (č. 3) a *Hanseniaspora* (č. 1, 2). Na úrovni druhu byly zařazeny vzorky č. 93, 115, 86, 96 jako *Hanseniaspora uvarum*, vzorky č. 104, 110, 125, 92, 106, 109, 116, 83, 88 jako *Pichia fermentans*.

5 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byly popsány odrůdy vína a vysvětleny determinanty kvality vína v komplexním pojetí. V další části byl charakterizován výrobní proces vína a také byly analyzovány moderní způsoby využití molekulární biotechnologie v produkci vína. Základní informace také byly zmíněny o ekologické a integrované produkce vína. Součástí teoretické části práce byla charakteristika kvasinek a jejich průmyslové využití. Poslední kapitoly byly věnovány identifikaci kvasinek ve víně a metodě PCR-RFLP, která byla použita v experimentální části diplomové práce k identifikaci kvasinek izolovaných z vinného moštu odrůdy Rulandské modré.

Pro experimentální část diplomové práce byly vzorky pro analýzu získány z vinného moštu a bobulí, které poskytl partner této diplomové práce vinařství Holánek. Celkové množství vzorků bylo 126, přičemž 52 z nich bylo z ekologické produkce a 68 z nich bylo integrované produkce. Zbylé vzorky byly získány z bobulí ekologické produkce (3 vzorky), integrované produkce (1 vzorek) a konvenční produkce (2 vzorky) vína.

Je nutné dodat, že nebyly analyzovány všechny vzorky z důvodu nedostatečného přečištění. Dodatečné přečištění vzorků nebylo z časových důvodů provedeno v rámci této diplomové práce, ale bude předmětem jiné práce v laboratoři. Vzorky, které nebyly analyzovány, jsou značeny v příloze 1 červeným podbarvením.

Pomocí PCR byly kvasinky rodově rozlišeny podle délky amplikonů na skupiny o velikosti 430, 450, 480, 500, 750, 880 bp u vzorků z ekologické produkce a 430, 450, 480, 500 a 880 bp u vzorků z integrované produkce. Pro taxonomické zařazení kvasinek na druhové úrovni byly postupně k PCR přidávány restriční endonukleázy *Hae*III, *Hinf*I a *Taq*I. Po inkubaci vzorků s konkrétními enzymy následovala elektroforetická detekce s následným porovnáním délek restričních fragmentů izolovaných kvasinek s délkami fragmentů typových kvasinek.

Ve vinném moštu z ekologické a integrované produkce byly shodně identifikovány kvasinky rodu *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida* a *Hanseniaspora*. Na druhové úrovni se podařilo identifikovat u ekologické produkce kvasinky *Pichia kluyveri*, *Candida stellata*, *Pichia fermentas*, *Pichia membranifaciens* a *Hanseniaspora viniae*. U integrované produkce byly identifikovány druhy *Hanseniaspora uvarum* a *Pichia fermentans*.

Využitím programu BioNumerics byly vzorky kvasinek analyzovány z hlediska genetické podobnosti. Výstupem analýzy byly dendrogramy, ve kterých byly kvasinky sloučeny do skupin podle své genetické podobnosti. U vzorků z ekologické produkce bylo vytvořeno 9 skupin a u vzorků z integrované produkce bylo vytvořeno 14 skupin.

Závěrem lze konstatovat, že rozdíly identifikovaných kvasinek v různých typech produkce nepotvrdily předpoklad kapitoly (2.2.2), že je vyšší rozmanitost kvasinek v ekologické než v integrované produkci vína. Ve všech typech produkce je zřejmý vysoký výskyt rodu *Pichia*, což ukazuje na možnou kontaminaci ze slupek bobulí nebo prostředí sklepa a nádob, kde probíhalo kvašení.

Pro dokonalejší taxonomické zařazení na druhové či kmenové úrovni kvasinek je vhodné aplikovat více restričních endonukleáz nebo PCR-RFLP zkombinovat s jinou molekulárně-biologickou metodou.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- 1) AMERINE, M. a SINGLETON, V. *Wine: an introduction*. 2nd ed. Berkeley: University of California Press, 1976. ISBN 978-052-0032-026.
- 2) NENADÁL, J. *Moderní management jakosti: principy, postupy, metody*. Vyd. 1. Praha: Management Press, 2008, 377 s. ISBN 978-807-2611-867.
- 3) SATYANARAYANA, T. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-140-2082-917.
- 4) FUGELSANG, K. a EDWARDS, Ch. *Wine microbiology*. 2nd ed. /. New York, NY: Springer, c2007, 393 s. ISBN 03-873-3349-5.
- 5) KRAUS, V., KUTTELVAŠER, Z. a VURM, B. *Encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Vurm, Foffová, 1997. ISBN 80-902363-3-2.
- 6) MINÁRIK, E., NAVARA, A.: *Chémia a mikrobiológia vína*. 1. vyd. Bratislava, 1986. s. 403.
- 7) FARKAŠ, J. *Technologie a biochemie vína*. 2. vyd. Praha: nak. technické literatury, 1980. 870s.
- 8) SANDLER, M. a PINDER, R. *Wine: a scientific exploration*. New York: Taylor, 2003, 320 s. ISBN 04-152-4734-9.
- 9) FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* [online]. 2008, roč. 8, č. 7, s. 979-995 [cit. 2012-04-17]. ISSN 15671356. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- 10) RIBÉREAU-GAYON, P. *Handbook of enology*. New York: Wiley, c2000. ISBN 0471973637.
- 11) KADLEC, P., MELZUCH, K., a VOLDŘICH, M. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- 12) ŠAMÁNEK, M. a URBANOVÁ, Z. *Víno na zdraví*. Vyd. 1. Praha: Agentura Lucie, 2010, 169 s. ISBN 978-80-87138-17-5.
- 13) PÁTEK, M., URBANOVÁ, Z. *Zrození vína: všechno o zpracování hroznů, výrobě vína a jeho zrání*. 2., rozš. vyd. Brno: Jota, 2000, 293 s. Jak na to (Jota). ISBN 80-721-7101-1.
- 14) PLAHUTA, P. a RASPOR, P. Comparison of hazards: Current vs. GMO wine. *Food Control* [online]. 2007, roč. 18, č. 5, s. 492-502 [cit. 2012-02-24]. ISSN 09567135. DOI:10.1016/j.foodcont.2005.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713506000107>
- 15) KOURKOUTAS, Y., KANELAKI, M., KOUTINAS, A. a TZIA, C. Effect of fermentation conditions and immobilization supports on the wine making. *Journal of Food Engineering* [online]. 2005, roč. 69, č. 1, s. 115-123 [cit. 2012-04-17]. ISSN 02608774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.08.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026087740400353X>

- 16) CSOMA, H., ZAKANY, N., CAPECE, A., ROMANO, P. a SIPICZKI, M. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2010, roč. 140, 2-3, s. 239-248 [cit. 2012-02-26]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510001650>
- 17) TRISTEZZA, M., GERARDI, C., LOGRIECO, A. a GRIECO, F. An optimized protocol for the production of interdelta markers in *Saccharomyces cerevisiae* by using capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2009, roč. 78, č. 3, s. 286-291 [cit. 2012-02-26]. ISSN 01677012. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.06.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701209001870>
- 18) HUANG, Ch., LEE, F. a TAI, Ch. A novel specific DNA marker in *Saccharomyces bayanus* for species identification of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2008, roč. 75, č. 3, s. 531-534 [cit. 2012-02-26]. ISSN 01677012. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.08.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701208003059>
- 19) ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- 20) JANDEROVÁ, B. a BENDOVIÁ, O. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999, 108 s. ISBN 80-718-4990-1.
- 21) KURTZMAN, C a FELL, J.. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, c2000, 1055 s. ISBN 04-448-1312-8.
- 22) Yeast physiology in ethanol production. *Rebel WP7: Bioenergy* [online]. 2009 [cit. 2012-03-10]. Dostupné z: <http://www.responsiblebusiness.eu/display/rebwp7/Yeast+physiology+in+ethanol+production>.
- 23) WINDE, J. *Functional genetics of industrial yeasts*. New York: Springer, c2003, 367 s. ISBN 35-400-2489-1.
- 24) HINKLE, R. *Good wine: The new basics*. San Fransisco: Silverback, 2005. ISBN 19-306-0378-9.
- 25) LASKIN, A. *Advances in applied microbiology*. New York: Academic Press, 2005. ISBN 01-200-2659-7.
- 26) TRAMPER, J. a ZHU, Y. *Modern biotechnology: panacea or new Pandora's box?*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2010. ISBN 978-908-6861-699.
- 27) Pinot Noir Lover. *Pinot Noir Lover* [online]. 2006 [cit. 2012-03-10]. Dostupné z: <http://www.pinotlover.com/>

- 28) MORTIMORE, S. a WALLACE, C. *The HACCP training resource pack trainer's manual*. 2nd ed. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 1998. ISBN 0-8342-1932-8.
- 29) HACCP Certifikace systému managementu bezpečnosti potravin. TÜV SÜD [online]. 2012 [cit. 2012-03-10]. Dostupné z: http://www.tuv-sud.cz/cz/sluzby/certifikace/haccp_certifikace_systemu_managementu_bezpecnosti_potravin
- 30) ČSN EN ISO 22000:2006 - Management bezpečnosti potravin. CQS - Sdružení pro certifikaci systémů jakosti [online]. 2010 [cit. 2012-03-10]. Dostupné z: <http://www.cqs.cz/Normy/CSN-EN-ISO-220002006-Management-bezpecnosti-potravin.html>
- 31) JHA, S. *Nondestructive evaluation of food quality: theory and practice*. Heidelberg: Springer-Verlag, c2010, 288 s. ISBN 36-421-5795-5.
- 32) HESSER, A. Why Wine Costs What It Does. *The New York Times: Archives* [online]. 2003 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <http://www.nytimes.com/2003/04/09/dining/why-wine-costs-what-it-does.html?pagewanted=all&src=pm>
- 33) Co ovlivňuje kvalitu vína. *Dotek vína* [online]. 2009 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <http://www.dotekvina.cz/co-ovlivnuje-kvalitu-vina-nc87/>
- 34) PAVLOUŠEK, P. *Výroba vína u malovínařů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 96 s. ISBN 80-247-1247-4.
- 35) Seriál o víně: Jak si vybrat dobrou láhev?. VOC ZNOJMO. *Vitalia.cz* [online]. 2012 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <http://www.vitalia.cz/clanky/serial-o-vine-jak-si-vybrat-dobrou-lahev/>
- 36) PLURA, J. *Plánování a neustálé zlepšování jakosti*. Vyd. 1. Praha: Computer Press, 2001, 244 s. ISBN 80-722-6543-1.
- 37) TOŠENOVSKÝ, J. *Statistické metody pro zlepšování jakosti*. Ostrava: Montanex, 2000, 362 s. ISBN 80-722-5040-X.
- 38) DUCHÁČ, P. *Management jakosti v chemických laboratořích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 54 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc..
- 39) CARRASCOSA SANTIAGO, A., MUÑOZ, R. a GONZÁLEZ R.. *Molecular wine microbiology*. 1st. ed. Boston: Academic Press, 2011, 363 s. ISBN 01-237-5021-0.
- 40) Yeast cell. *Wikipedie* [online]. 2006 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Yeast_cell.cs.svg
- 41) HRUŠKA, S. Výroba vína. *Víno Hruška* [online]. 2008 [cit. 2012-03-24]. Dostupné z: <http://www.vinohruska.cz/vyroba-vina.html>
- 42) Ekologičtí pěstitelé vína chtějí chránit ohroženou faunu a flóru. *Vinopark* [online]. 2009 [cit. 2012-03-27]. Dostupné z:

<http://www.vinopark.cz/magazin/clanek/ekologicti-pestitele-vina-chteji-chranit-ohrozenou-faunu-a-floru/>

- 43) Členské státy EU odsouhlasily nová pravidla pro ekologické víno. *Biospotřebitel.cz* [online]. 2011 [cit. 2012-03-27]. Dostupné z: <http://www.biospotřebitel.cz/biospotřebitel/clanek/155478/clenske-staty-eu-odsouhlasily-nova-pravidla-pro-ekologicke-vino.html>
- 44) SWIACKÁ, E. a HORKÁ, S. Téma: Víno z ekologicky vypěstovaných hroznů. *Ekologické listy* [online]. 2012 [cit. 2012-03-27]. Dostupné z: http://www.ekologickelisty.cz/index.php?option=com_content&task=view&id=918&Itemid=43
- 45) KRAUS, V. *Pěstujeme révu vinnou*. 1. vyd. Praha: Grada, 2003, 96 s. Česká zahrada. ISBN 80-247-0562-1.
- 46) PAVLOUŠEK, P. *Pěstování révy vinné*. Praha: Grada, c2011, 333 s. ISBN 978-80-247-3314-2.
- 47) HORÁK, J. a ROD, J. *Účinná ochrana zahradních plodin: rostlinolékař radí*. Praha: Grada, 2011, 128 s. ISBN 978-80-247-3588-7.
- 48) V obchodech se objeví české biovíno, má ale špatnou pověst. I kvůli Němcům. *Ihned.cz* [online]. 2012 [cit. 2012-03-27]. Dostupné z: <http://zpravy.ihned.cz/c1-55168160-v-obchodech-se-objevi-ceske-biovino-ma-ale-spatnou-povest-i-kvuli-nemcum>
- 49) ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- 50) TANG, Y. a STRATTON, Ch. *Advanced techniques in diagnostic microbiology*. New York, N.Y.: Springer, 2006, 540 s. ISBN 03-872-9741-3.
- 51) Analýza SLG genu řepky olejky metodou PCR-RFLP. *EAMOS: Výukový systém* [online]. 2012 [cit. 2012-03-31]. Dostupné z: http://www.eamos.cz/amos/bc/externi/bc_154/Metod_TRACENET_D.pdf
- 52) HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 286 s. ISBN 80-247-1562-7.
- 53) SOLOMON, E., BERG, L. a MARTIN, D. *Biology*. 7th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole Thomson Learning, c2005. ISBN 05-344-9547-8.
- 54) RAPLEY, R. a WALKER, J. *Molecular biomethods handbook*. 2nd ed. / . Totowa, NJ: Humana Press, c2008, 1124 s. ISBN 16-032-7374-3.
- 55) Amplifikační metody. *Amplifikační metody* [online]. 2012 [cit. 2012-04-17]. Dostupné z: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>
- 56) STEIDL, R. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní salon vín, 2002, 307 s. ISBN 80-903-2010-4.
- 57) MIKUŠOVÁ, K. a KOLLÁROVÁ, M. *Princípy biochemie*. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava, 2005. ISBN 80-223-1987-2.
- 58) DNA double helix. *DNA sequencing* [online]. 2007 [cit. 2012-04-01]. Dostupné z: <http://www.dna-sequencing-service.com/tag/dna-double-helix/>

- 59) ROEHR, M. *The biotechnology of ethanol: classical and future applications*. New York: Wiley-VCH, c2001, 232 s. ISBN 35-273-0199-2.
- 60) STEIDL, R. a LEINDL, G. *Cesta ke špičkovému vínu*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2004, 67 s. ISBN 80-903-2014-7.
- 61) STEPHENSON, F. *Calculations for molecular biology and biotechnology: a guide to mathematics in the laboratory*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2010. ISBN 978-012-3756-909.
- 62) VEBER, J. *Řízení jakosti a ochrana spotřebitele*. 2., aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2007, 201 s. ISBN 978-80-247-1782-1.
- 63) Úplné znění zákona č. 115 / 1995 Sb.: o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících právních předpisů, jak vyplývá ze změn provedených zákonem č. 216 / 2000 Sb. In: *Vinařský zákon*. 1995.
- 64) KERZNER, H. *Project management: a systems approach to planning, scheduling, and controlling*. 10th ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2009, 1094 s. ISBN 9780470278703.
- 65) ŠURANSKÁ, H. *Identifikace vinných kvasinek metodou PCR-RFLP*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 100 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- 66) QUEROL, A. a FLEET, G. *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer, c2006, 453 s. ISBN 978-354-0283-881.
- 67) Tiskové zprávy. *Ekologické zemědělství: Šetrné k přírodě, prospěšné pro vás*. [online]. 2012 [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/agriculture/organic/files/news/IP-12-113_EN.pdf
- 68) ŠKODOVÁ, A. *Identifikace kvasinek rodu Saccharomyces z listů, bobulí a moštu révy vinné*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 61 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- 69) PROCHÁZKOVÁ, L. *Kontrola kvasného procesu vinného moštu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 71 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D..
- 70) ZDEŇKOVÁ, M. *Identifikace kvasinek rodu Saccharomyces během kvašení bílého vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 63 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- 71) JIŘÍKOVÁ, I. *Vliv způsobu pěstování vinné révy na populaci kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 78 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- 72) ESTEVE-ZARZORO, B., BELLOCH, F., URUBURU a A. QUEROL. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999, s. 329-337.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ATP	adenosin trifosfát
bp	pár bází
C	cytozin
CCY	Sbírka kultur kvasinek v Bratislavě
ČR	Česká republika
ČSN	česká technická norma
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	nukleotid
EC	European Commission
EEC	European Economic Community
Ekovín	Svaz integrované a ekologické produkce vína hroznů
EN	evropská norma
ES	Evropský parlament a rada
EU	Evropská unie
G	guanin
GMO	geneticky modifikovaný organizmus
GRAS	General Recognised as Safe
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Points
ISO	International Organization for Standardization
ITS	The Internal Transcribed Spacer
KI (°)	Klosterneuburský moštoměr
mRNA	mediátorová RNA
NAD ⁺	oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH + H ⁺	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NM (°)	normalizovaný moštoměr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	PCR restriction fragment length polymorphism
QMS	Quality Management System
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
REB	Rulandské modré, ekologická produkce, bobule
REM	Rulandské modré, ekologická produkce, mošt
RIB	Rulandské modré, integrovaná produkce, bobule
RIM	Rulandské modré, integrovaná produkce, mošt
RKB	Rulandské modré, konvenční produkce, bobule
RNA	Ribonukleová kyselina
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SMJ	Systém managementu jakosti
SSCP	single-strand conformation polymorphism

SSR	simple sequence repeats
T	thimyn
TBE pufr	tris-borate-EDTA pufr
T _m	teplota tání
U	uracyl
US-FDA	US - The Food and Drug Administration
UV světlo	ultrafialové světlo

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Tabulka identifikačních čísel odebraných vzorků

Příloha 2: Elektroforeogramy PCR produktů

Příloha 3: Elektroforeogramy restrikčních fragmentů získaných pomocí restrikční endonukleázy *HaeIII*

Příloha 4: Elektroforeogramy restrikčních fragmentů získaných pomocí restrikční endonukleázy *HinfI*

Příloha 5: Elektroforeogramy restrikčních fragmentů získaných pomocí restrikční endonukleázy *TaqI*

Příloha 6: Dendrogram – ekologická produkce 2011/2012

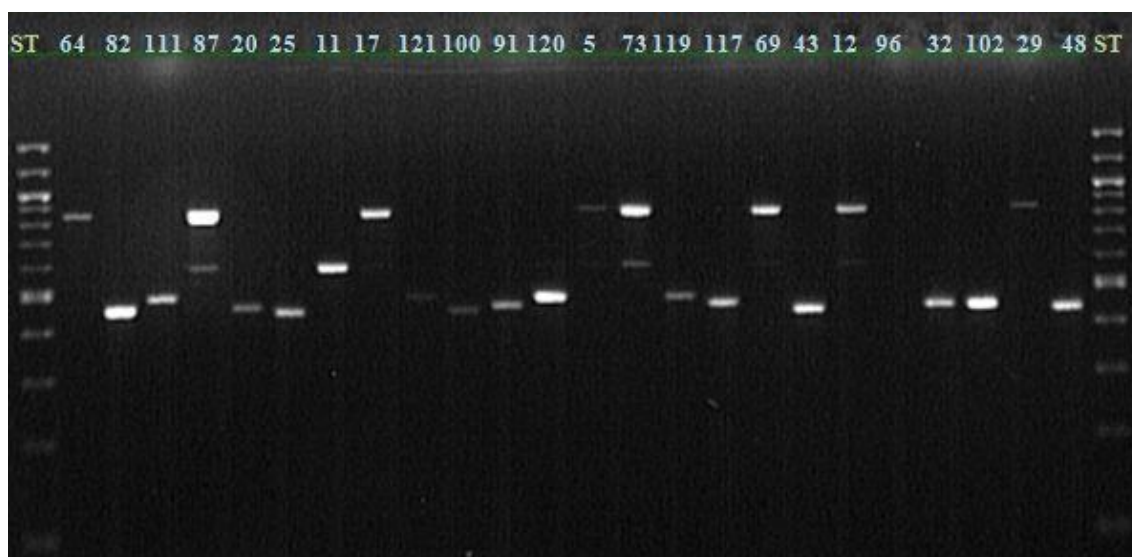
Příloha 7: Dendrogram – integrovaná produkce 2011/2012

9 PŘÍLOHY

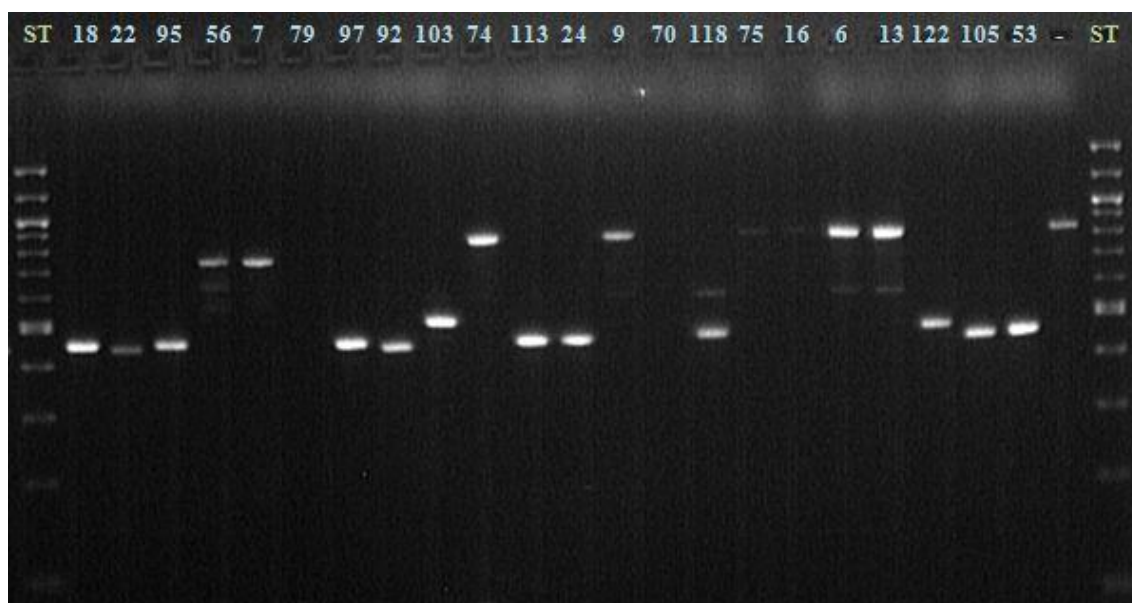
Příloha 1: Tabulka identifikačních čísel odebraných vzorků (červeně podbarvené jsou vzorky, které nebyly zpracovány z důvodu nedostatečného přečištění)

Identifikační číslo	Odběr	Identifikační číslo	Odběr	Identifikační číslo	Odběr
1	REM9	43	REB	85	RIM4
2	REM6	44	REM2	86	RIM5
3	REM10	45	REM6	87	RIM5
4	REM3	46	REM11	88	RIM6
5	REM8	47	REM11	89	RIM6
6	REM8	48	REM5	90	RIM6
7	REM8	49	REM11	91	RIM1
8	REM11	50	REM4	92	RIM1
9	REM7	51	REM8	93	RIM2
10	REM7	52	RKB	94	RIM2
11	REM2	53	REM2	95	RIM2
12	REM10	54	REM2	96	RIM1
13	REM5	55	REM2	97	RIM1
14	REM5	56	RKB	98	RIM1
15	RIB	57	REB	99	RIM3
16	REM10	58	REM4	100	RIM3
17	REM6	59	RIM2	101	RIM7
18	REM2	60	RIM4	102	RIM8
19	REM2	61	RIM6	103	RIM7
20	REM4	62	RIM8	104	RIM7
21	REM4	63	RIM9	105	RIM7
22	REM4	64	RIM11	106	RIM7
23	REM4	65	RIM11	107	RIM7
24	REM3	66	RIM11	108	RIM7
25	REM9	67	RIM11	109	RIM8
26	REM4	68	RIM10	110	RIM8
27	REM10	69	RIM10	111	RIM8
28	REM10	70	RIM1	112	RIM9
29	REB	71	RIM3	113	RIM9
30	REM3	72	RIM4	114	RIM10
31	REM7	73	RIM4	115	RIM1
32	REM3	74	RIM5	116	RIM5
33	REM3	75	RIM5	117	RIM10
34	REM6	76	RIM5	118	RIM8
35	REM8	77	RIM7	119	RIM8
36	REM10	78	RIM7	120	RIM7
37	REM8	79	RIM7	121	RIM1
38	REM10	80	RIM9	122	RIM1
39	REM11	81	RIM2	123	RIM2
40	REM5	82	RIM2	124	RIM6
41	REM1	83	RIM4	125	RIM4
42	REM5	84	RIM4	126	RIM1

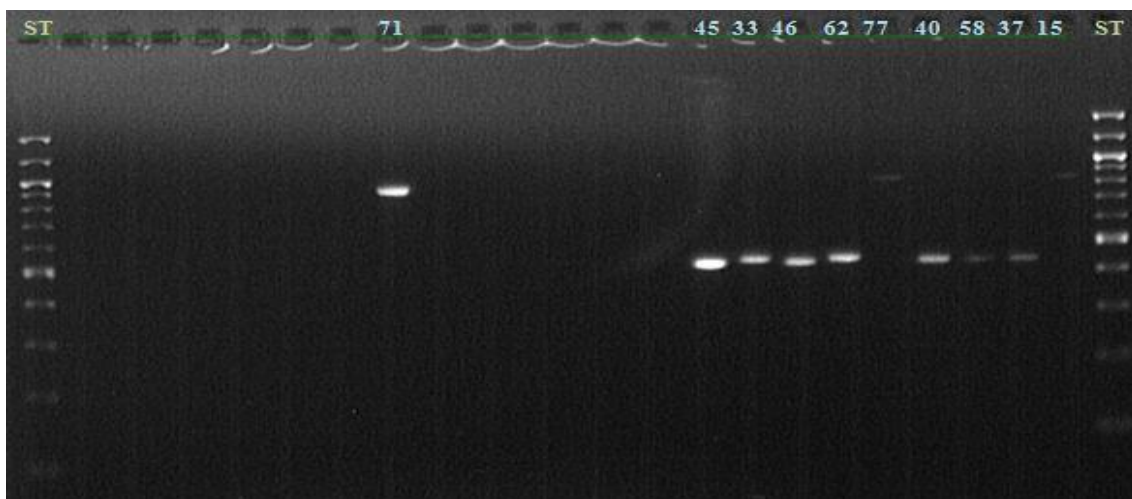
Příloha 2: Elektroforeogramy PCR produktů



*Obr. 1: Elektroforeogram PCR produktů získaný amplifikací primery ITS1 a ITS4.
(ST – délkový standard 100 bp)*



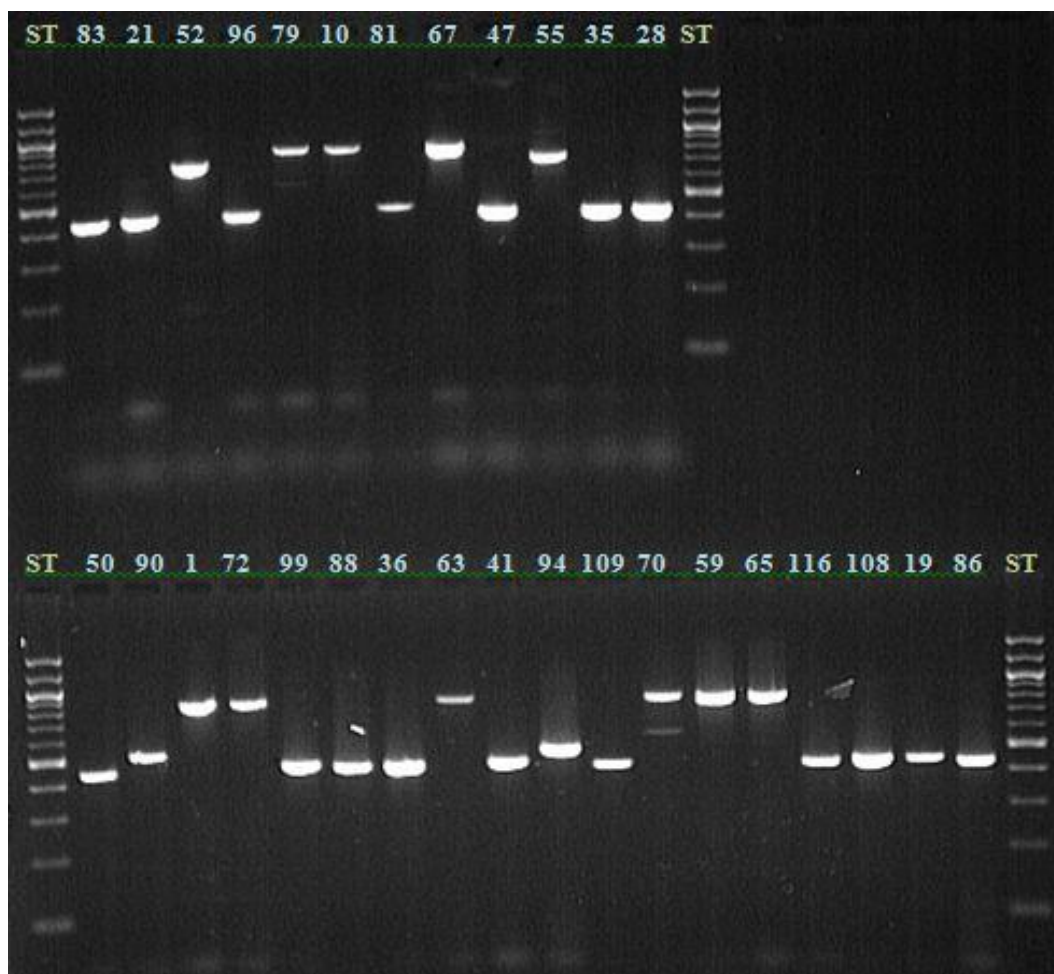
*Obr. 2: Elektroforeogram PCR produktů získaný amplifikací primery ITS1 a ITS4.
(ST – délkový standard 100 bp)*



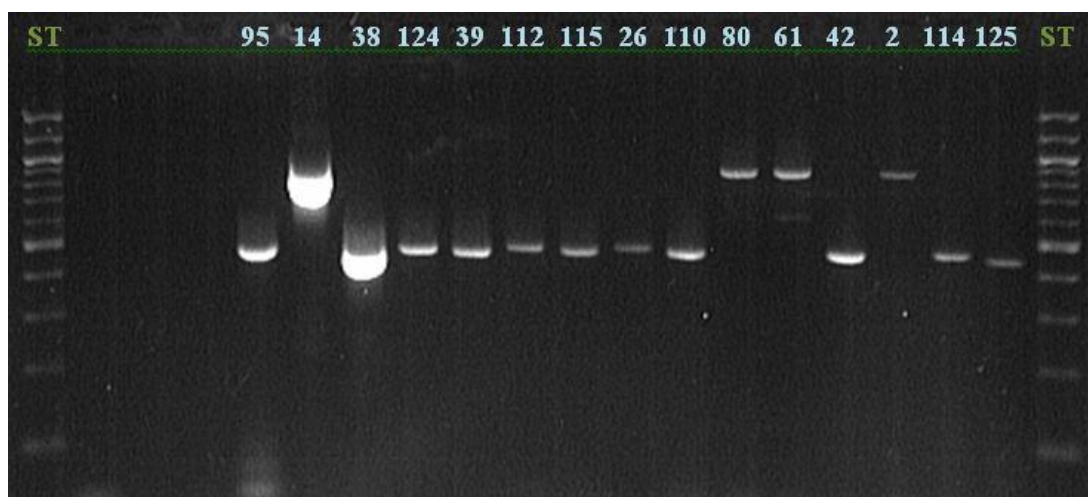
Obr. 3: Elektroforeogram PCR produktů získaný amplifikací primery ITS1 a ITS4.
(*ST* – délkový standard 100 bp)



Obr. 4: Elektroforeogram PCR produktů získaný amplifikací primery ITS1 a ITS4.
(*ST* – délkový standard 100 bp, *NK* – negativní kontrola)

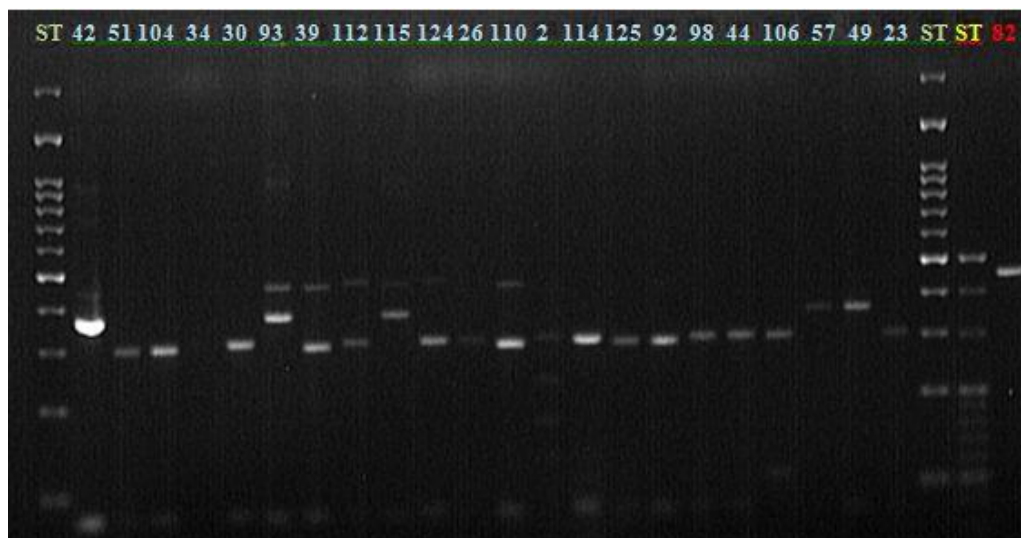


Obr. 5: Elektroforeogram PCR produktů získaný amplifikací primery ITS1 a ITS4.
(*ST* – délkový standard 100 bp)

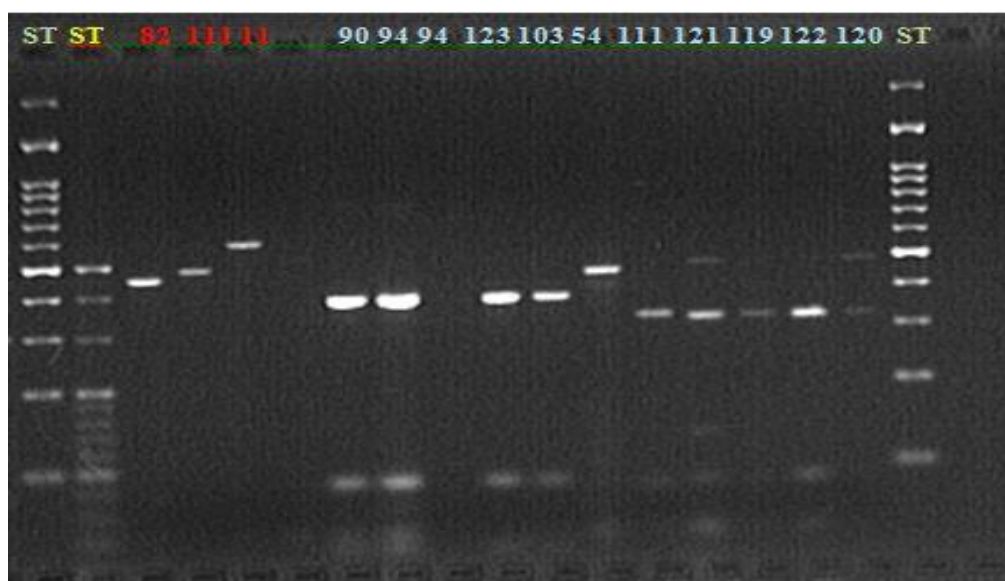


Obr. 6: Elektroforeogram PCR produktů získaný amplifikací primery ITS1 a ITS4.
(*ST* – délkový standard 100 bp)

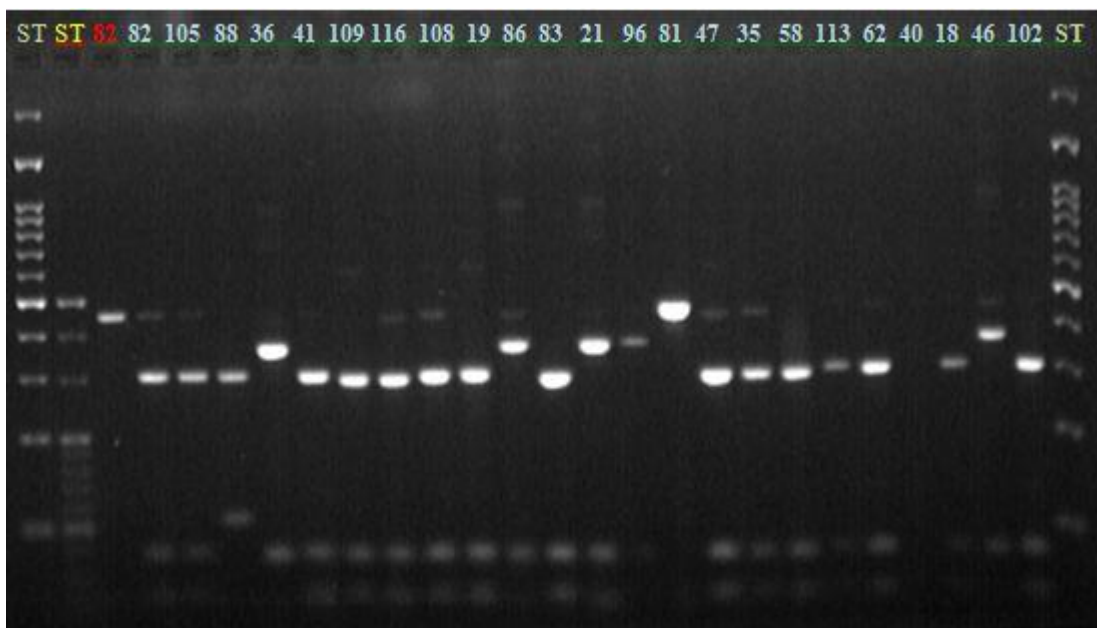
Příloha 3: Elektroforeogramy restrikčních fragmentů získaných pomocí restrikční endonukleázy *Hae*III



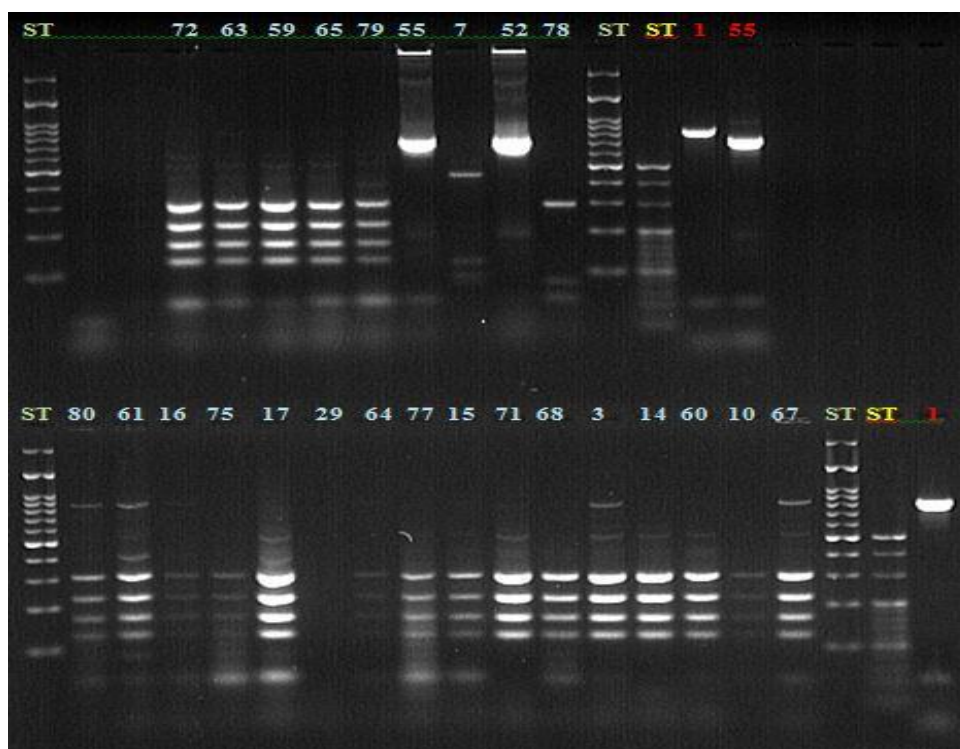
Obr. 7: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *Hae*III, (ST – délkový standard 100 bp, ST – délkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 82).



Obr. 8: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *Hae*III, (ST – délkový standard 100 bp, ST – délkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 82, 111, 11).

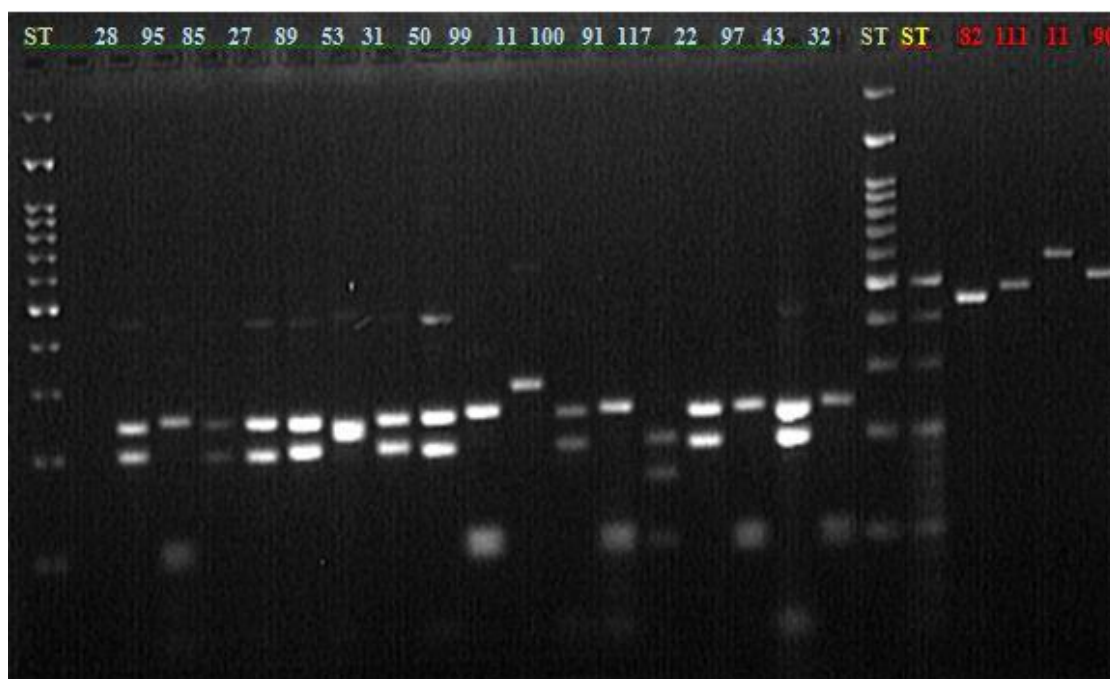


Obr. 9: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy HaeIII, (ST – délkový standard 100 bp, ST – délkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 82).

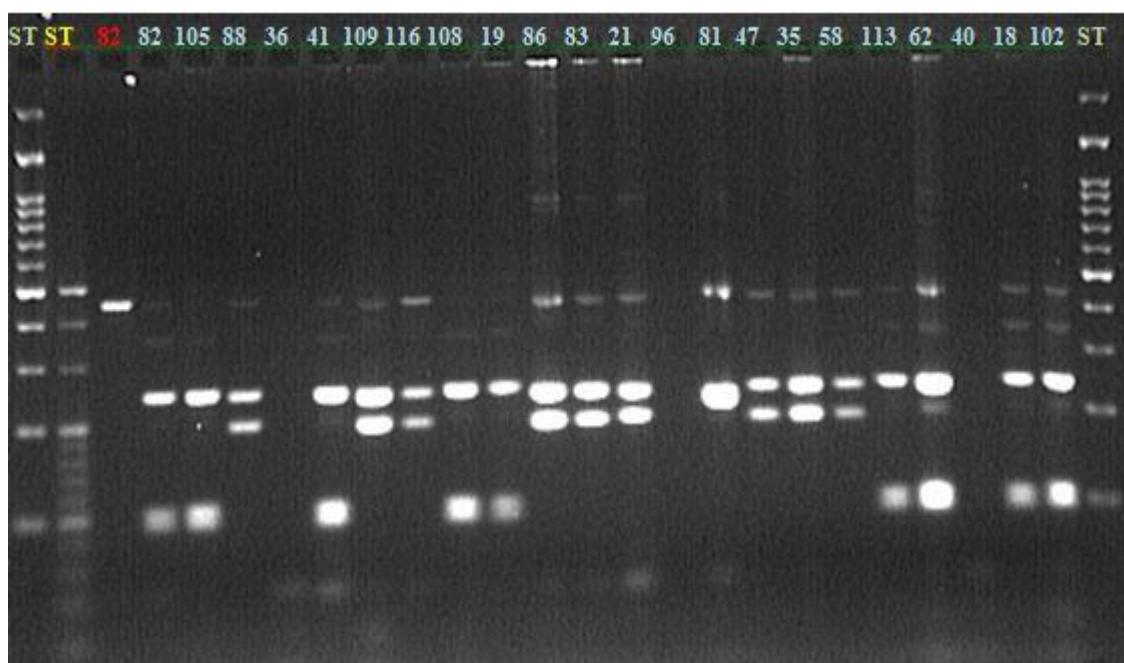


Obr. 10: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy HaeIII, (ST – délkový standard 100 bp, ST – délkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 1, 55).

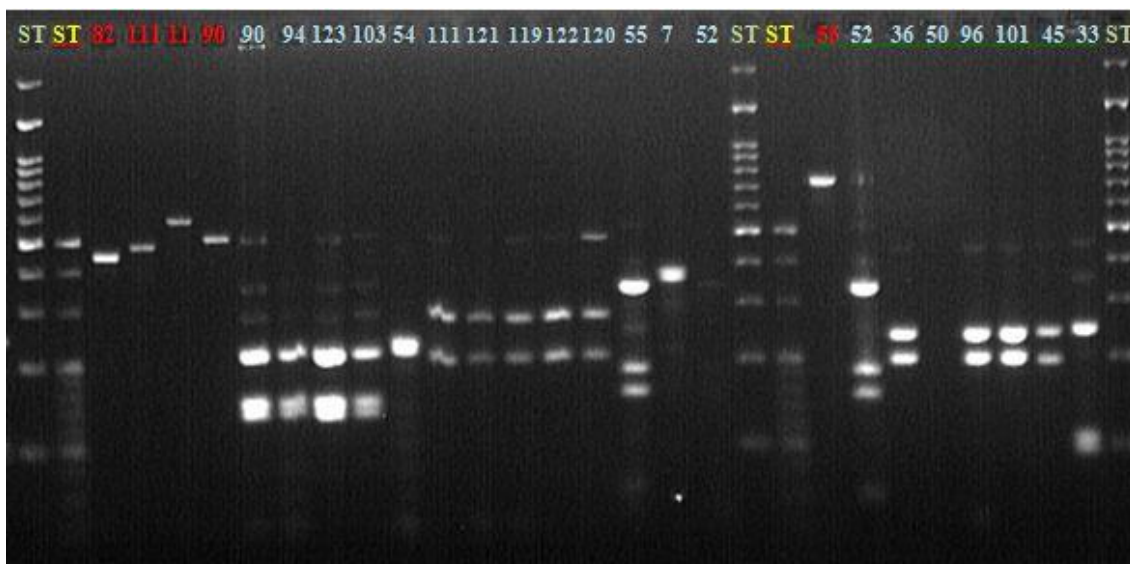
Příloha 4: Elektroforeogramy restrikčních fragmentů získaných pomocí restrikční endonukleázy *HinfI*



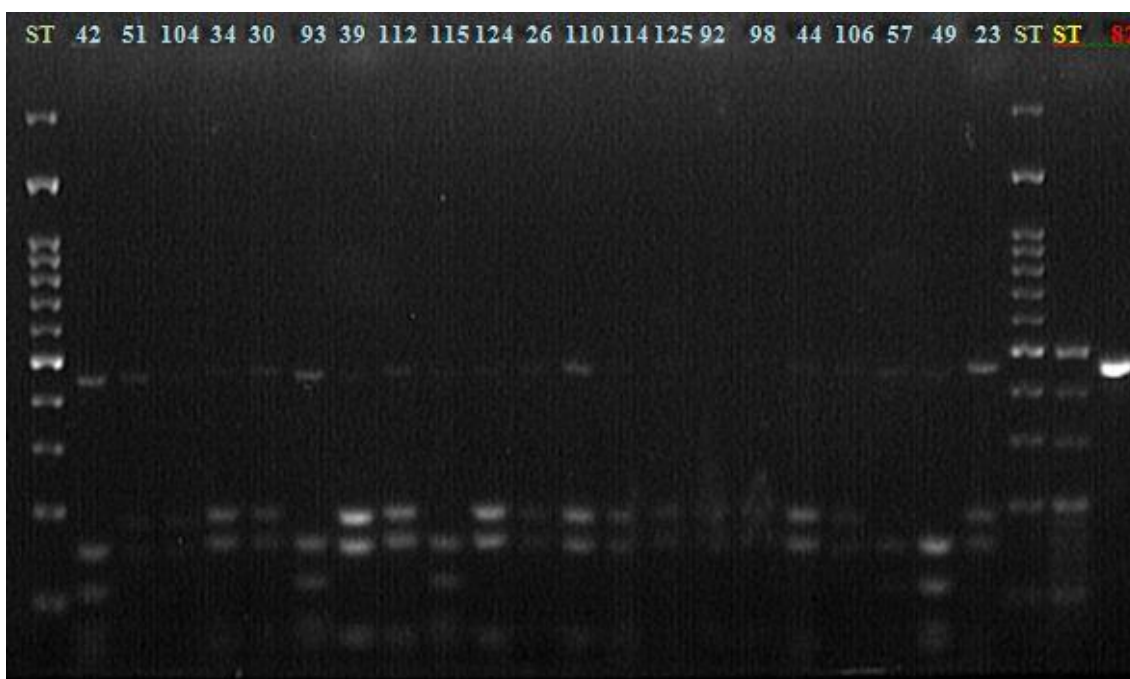
Obr. 11: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *HinfI*, (ST – délkový standard 100 bp, ST – délkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 82, 111, 11, 90).



Obr. 12: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *HinfI*, (ST – délkový standard 100 bp, ST – délkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 82).

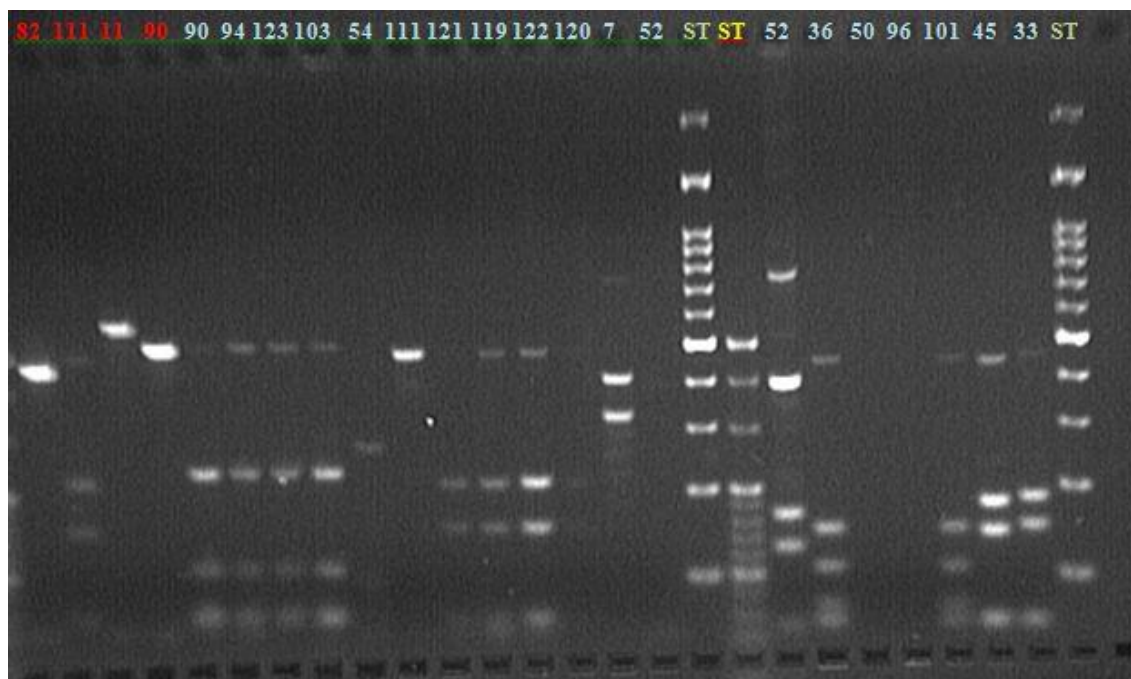


Obr. 13: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *HinfI*, (*ST* – délkový standard 100 bp, **ST** – délkový standard 20 bp, pozitivní kontrola – 82, 111, 11, 90, 55).

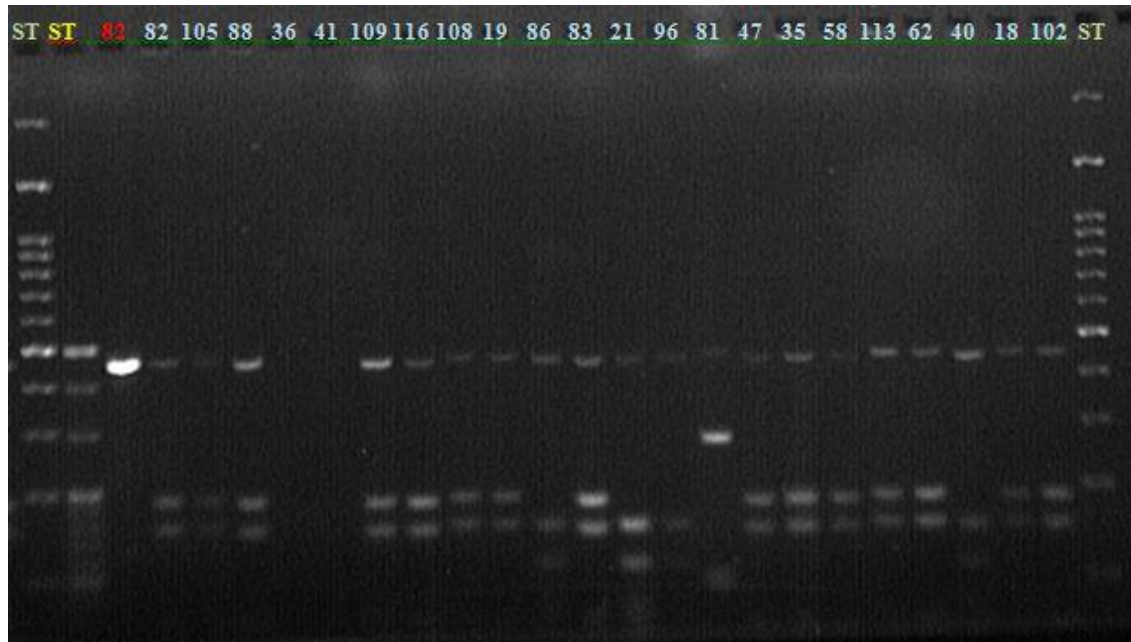


Obr. 14: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *TaqI*, (*ST* – délkový standard 100, **ST** – délkový standard 20, pozitivní kontrola – 82)

Příloha 5: Elektroforeogramy restrikčních fragmentů získaných pomocí restrikční endonukleázy *TaqI*

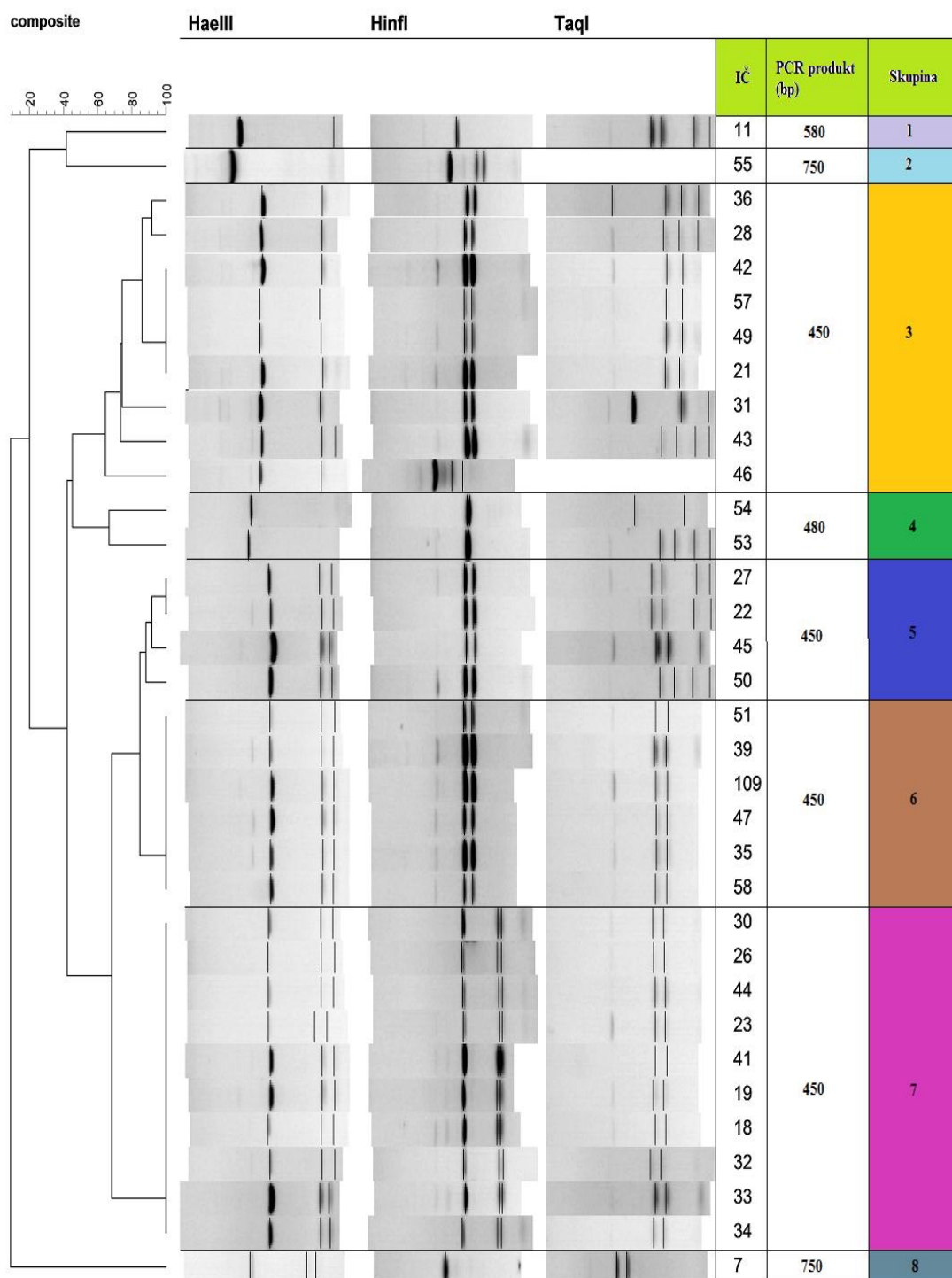


Obr. 15: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *TaqI*, (ST – délkový standard 100, ST – délkový standard 20, pozitivní kontrola – 82, 111, 11, 90)

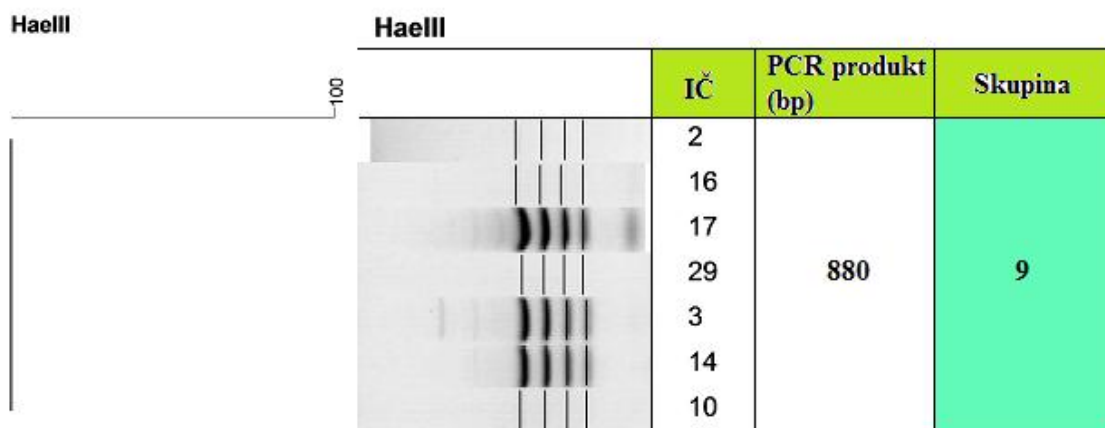


Obr. 16: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktu pomocí restrikční endonukleázy *TaqI*, (ST – délkový standard 100, ST – délkový standard 20, pozitivní kontrola – 82)

Příloha 6: Dendrogram – ekologická produkce 2011/2012

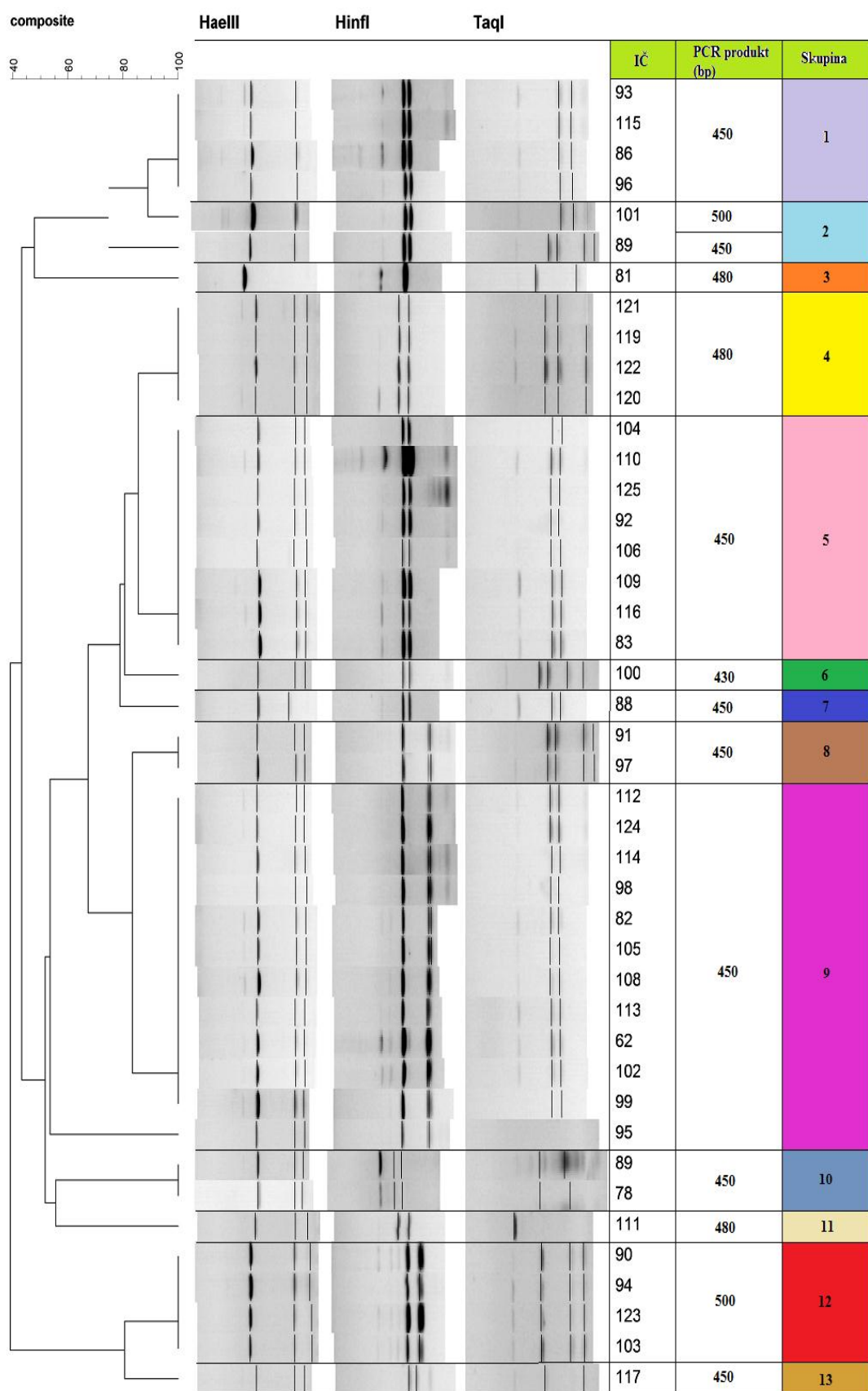


Obr. 18: Dendrogram – ekologická produkce



Obr. 19: Dendrogram – ekologická produkce

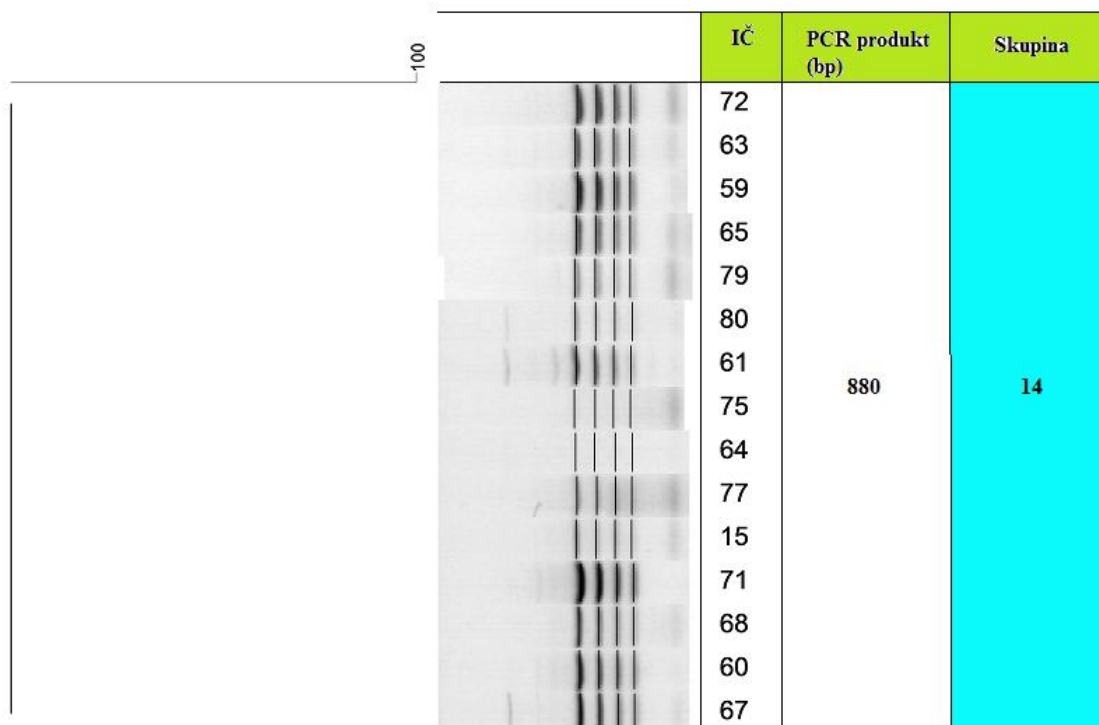
Příloha č. 7: Dendrogram – integrovaná produkce 2011/2012



Obr. 20: Dendrogram – integrovaná produkce

HaeIII

HaeIII



Obr. 21: Dendrogram – integrovaná produkce